

**Untersuchungen zur Beziehung zwischen dem
Erythrozyten-Aggregationswert (AW) und
kardiovaskulären Risikofaktoren sowie zum
Mechanismus der Erythrozyten-Aggregation**

Georg Mössmer

1987



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554616_0003

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie
Arbeitsgruppe Experimentelle Medizin
Vorstand: Prof. Dr. Dr. G. Ruhenstroth-Bauer

Untersuchungen zur Beziehung zwischen dem
Erythrozyten-Aggregationswert (AW) und
kardiovaskulären Risikofaktoren sowie zum
Mechanismus der Erythrozyten-Aggregation

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
G e o r g M ö s s m e r
aus
Zürich

1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter : Prof. Dr. Dr. G. Ruhenstroth-Bauer

1. Mitberichterstatter : Prof. Dr. G. Riecker

2. Mitberichterstatter : Prof. Dr. U. Jehn

Dekan : Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung : 25. Juni 1987

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. G. Ruhenstroth-Bauer (Leiter der Arbeitsgruppe Experimentelle Medizin am Max-Planck-Institut für Biochemie) für die gestellte Aufgabe, die stets großzügige und geduldige Unterstützung und die wertvollen Anregungen bei der Durchführung der Arbeit.

Herrn Dr. U. Keil (Leiter der Arbeitsgruppe Epidemiologie des Instituts für Medizinische Informatik und Systemforschung (MEDIS) der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung (GSF) in Neuherberg) danke ich für die Ermöglichung des epidemiologischen Teils der Untersuchung im Rahmen der 1. Querschnittsstudie des MONICA-Projektes Augsburg. Frau Dr. J. Stieber, Frau A. Döring, Herrn Dr. W. König sowie allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Epidemiologie und der Fa. Socialdata danke ich für die gute Zusammenarbeit und die zahlreichen Ratschläge bei der Durchführung und Auswertung der Untersuchung.

Herrn Dr. W. Lehmacher (Leiter der Arbeitsgruppe Auswertungssoftware des MEDIS-Instituts) danke ich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Herrn Dr. E. Ernst (Klinik für Physikalische Medizin der Ludwig-Maximilians-Universität München) danke ich für die Überlassung der Plasmapviskositätsmeßwerte.

Frau Prof. I. Witt und Herrn Dr. H.-H. Seydewitz (Kinderklinik der Universität Freiburg i. Breisgau) danke ich für die Überlassung von Fibrinogenproben mit hohem bzw. niedrigem Phosphorylierungsgrad.

Meinen Kollegen Dr. J. Ottl, Dr. S. Vogl, G. Hoffmann, Dr. V. Kachel, E. Glossner, H. Schneider, Dr. T. Lintzen und Frau B. Scholz danke ich für die gute Zusammenarbeit und ihre stete Hilfsbereitschaft.

Die vorliegende Arbeit wurde mit Unterstützung durch ein Promotionsstipendium der Studienstiftung des Deutschen Volkes angefertigt.

INHALTSÜBERSICHT

1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	5
2.1.	Definition und Bestimmungsmethode des Erythrozyten-Aggregationswertes (AW)	5
2.1.1.	Prinzip der elektronischen Partikelvolumenmessung nach COULTER	5
2.1.2.	Meßtechnische Probleme der COULTER-Methode	7
2.1.2.1.	Determinanten von Form und Amplitude des Meßimpulses	7
2.1.2.2.	Einfluß der Durchtrittsbahn	8
2.1.3.	Verbesserte COULTER-Methode mit hydrodynamischer Fokussierung nach KACHEL	12
2.1.4.	Meßapparatur für die AW-Bestimmung	13
2.1.4.1.	Meßeinheit (Metricell)	14
2.1.4.2.	Auswertungseinheit (Cytomic 12)	16
2.1.5.	AW-Bestimmung	17
2.1.5.1.	Untersuchungsmaterial	17
2.1.5.2.	Blutabnahme	18
2.1.5.3.	Aufbereitung der Blutproben	19
2.1.5.4.	Ablauf der AW-Messung	20

2.1.5.5.	Berechnung des AW	24
2.1.6.	Herstellung der Lösungen	28
2.1.6.1.	Tris/HCl/EDTA-Puffer (Probenpuffer)	29
2.1.6.2.	Suspensionsmedium (Dextranlösung)	29
2.1.6.3.	Hüllstromelektrolyt	30
2.1.6.4.	Messung von pH, Osmolalität und Leitfähigkeit	31
2.1.7.	Eichung des Metricell-Gerätes	31
2.1.8.	Reproduzierbarkeit der AW-Messung	32
2.1.9.	Verbesserung der Methode	33
2.1.10.	Ausschlußkriterien für die AW-Messung	36
2.2.	AW-Messungen im Rahmen des MONICA-Projektes Augsburg	37
2.2.1.	Das internationale MONICA-Projekt	37
2.2.2.	MONICA-Projekt Augsburg	39
2.2.3.	1. Querschnittsstudie des MONICA-Projektes Augsburg	42
2.2.3.1.	Stichprobe	42
2.2.3.2.	Organisation	43
2.2.3.3.	Untersuchungsprogramm	44
2.2.3.4.	Datenschutz	46
2.2.4.	AW-Bestimmung im Rahmen der 1. Querschnitts- studie des MONICA-Projektes Augsburg	47

2.2.4.1.	Organisation	47
2.2.4.2.	Probanden	48
2.2.4.3.	Blutentnahme und Aufarbeitung der Proben	48
2.2.4.4.	Auswertung	50
2.2.4.4.1.	Ausgewertete Probanden	50
2.2.4.4.2.	Risikofaktordefinitionen	51
2.2.4.4.3.	Statistische Methoden	52
2.3.	In vitro-Versuche zum Mechanismus der Erythrozyten-Aggregation	54
2.3.1.	AW und Phosphorylierungsgrad des Fibrinogens	54
2.3.2.	AW nach Inkubation von Plasma bzw. Zugabe von Lysolecithin	59
2.3.3.	AW nach Neuraminidase-Behandlung von Plasma	60
2.3.4.	Versuche mit Thrombozyten	64
3.	ERGEBNISSE	67
3.1.	AW-Bestimmungen im Rahmen des MONICA-Projektes Augsburg	67
3.1.1.	Risikofaktorenprofil der untersuchten Stichprobe	67
3.1.2.	AW in Abhängigkeit von Geschlecht und Alter	75
3.1.3.	AW und Hauptrisikofaktoren	77
3.1.4.	AW und hormonelle Kontrazeption	83

3.1.5.	Multivariate Analyse der Korrelationen zwischen AW und kardiovaskulären Risikofaktoren bzw. Risikoindikatoren	83
3.2.	In vitro-Versuche zum Mechanismus des AW	83
3.2.1.	AW und Phosphorylierungsgrad des Fibrinogens	93
3.2.2.	AW nach Inkubation von Plasma bzw. Zugabe von Lysolecithin	93
3.2.3.	AW nach Neuraminidase-Behandlung von Plasma	97
3.2.4.	Versuche mit Thrombozyten	98
4.	BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE	100
4.1.	AW-Bestimmungen im Rahmen des MONICA-Projektes	100
4.1.1.	Zur Frage der Repräsentativität der untersuchten Stichprobe	100
4.1.2.	AW und kardiovaskuläre Risikofaktoren	102
4.1.2.1.	Stratifizierungsmodell	102
4.1.2.2.	Multivariate Analyse	103
4.1.3.	AW und Atherosklerose	105
4.2.	In vitro-Versuche zum Mechanismus des AW	107
4.2.1.	AW und Phosphorylierungsgrad des Fibrinogens	107
4.2.2.	AW nach Inkubation von Plasma bzw. Zugabe von Lysolecithin	111
4.2.3.	AW nach Neuraminidase-Behandlung von Plasma	113
4.2.4.	Versuche mit Thrombozyten	114

5.	ZUSAMMENFASSUNG	118
6.	LITERATURVERZEICHNIS	120

1. EINLEITUNG

Atherosklerotische Gefäßveränderungen und die aus ihnen resultierenden chronisch ischämischen Erkrankungen (koronare Herzkrankheit, zerebrale Ischämie, periphere arterielle Verschlusskrankheit), sowie deren akute Komplikationen (Herzinfarkt, Schlaganfall) gehören neben den bösartigen Neubildungen zu den medizinischen Hauptproblemen in den entwickelten Industriestaaten. Sie sind für nahezu die Hälfte aller Todesfälle verantwortlich.

Trotz großer Forschungsanstrengungen während der letzten Jahrzehnte sind noch viele Fragen im Zusammenhang mit Ätiologie, Pathogenese und Prävention dieser komplexen multifaktoriell bedingten Zivilisationskrankheiten ungeklärt. Zwar konnten in großen epidemiologischen Langzeitstudien Risikofaktoren wie Hypertonie, Hypercholesterinämie und Rauchen identifiziert werden, die die durchschnittliche Erkrankungs Wahrscheinlichkeit erhöhen, und bei manchen genetisch determinierten Fällen, wie z.B. der familiären Hypercholesterinämie, sind große Fortschritte in der Erforschung der molekularen Mechanismen erzielt worden; auch die invasive Diagnostik sowie die medikamentöse und operative Therapie (Bypass-Chirurgie, Dilatation) haben einen hohen Standard erreicht.

Prävention und Früherkennung der Atherosklerose sind andererseits dadurch erschwert, daß das Risikofaktorenkonzept nur bedingt individuelle Risikoabschätzungen erlaubt und bis heute keine nichtinvasive Methode zur frühzeitigen Erkennung von latenten atherosklerotischen Prozessen zur Verfügung

steht.

Seit einigen Jahren finden in diesem Zusammenhang hämorheologische Untersuchungsverfahren zunehmendes Interesse. Zum einen weist eine ganze Reihe von Befunden darauf hin, daß die Fließeigenschaften des Blutes bei atherosklerotischen Erkrankungen verändert sind. Dieser Umstand eröffnet die grundsätzliche Möglichkeit, hämorheologische Meßgrößen wie Vollblutviskosität, Plasmaviskosität, Erythrozytenflexibilität und Erythrozytenaggregation als kardiovaskuläre Risikoindikatoren heranzuziehen. Zum anderen könnte der Fließfähigkeit des Blutes eine entscheidende Rolle für die Mikrozirkulation zukommen, wenn die beiden anderen, unter normalen Bedingungen überwiegenden Faktoren, nämlich Herzleistung und Vasomotorik, erschöpft sind, z.B. im Schock bzw. bei hochgradig stenosierten Gefäßen [59,68,84,98].

Neben der Zellkonzentration (Hämatokrit), der Plasmaviskosität und der Flexibilität der Erythrozyten ist die Erythrozytenaggregation ein wichtiger Einflußfaktor der Blutviskosität [12,15,59,68,84]. Für die direkte Quantifizierung der Erythrozytenaggregation in vitro wurden verschiedene Verfahren ausgearbeitet: Direkte mikroskopische Betrachtung [21], photometrische Transmissionsmessung [51,52,85] und Bildanalyse von mikroskopischen (Video-)Aufnahmen [90,93] bei definierten Schergraden.

Am MPI für Biochemie wurde auf der Basis des elektronischen Verfahrens zur Partikelvolumenbestimmung nach COULTER eine durchflußzytometrische Methode entwickelt, bei der das Ausmaß der Aggregation aus der unter standardisierten Bedingun-

gen gemessenen Volumenverteilungskurve der Erythrozyten ermittelt und als Aggregationswert (AW) angegeben wird. In früheren klinischen Untersuchungen fand sich eine positive Assoziation zwischen dem AW und atherosklerotischen Gefäßkrankungen sowie ihren Risikofaktoren. Patienten mit angiographisch gesicherter koronarer Herzerkrankung, Diabetiker mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit und Raucher haben im Mittel einen höheren AW als klinisch gesunde Probanden. Der AW korreliert positiv mit der Anzahl der kardiovaskulären Risikofaktoren [8-11,39-45,67,71,72,75,76,102]. Abb.1 zeigt typische Volumenverteilungskurven von Probanden mit niedrigem (a) bzw. hohem (b) AW.

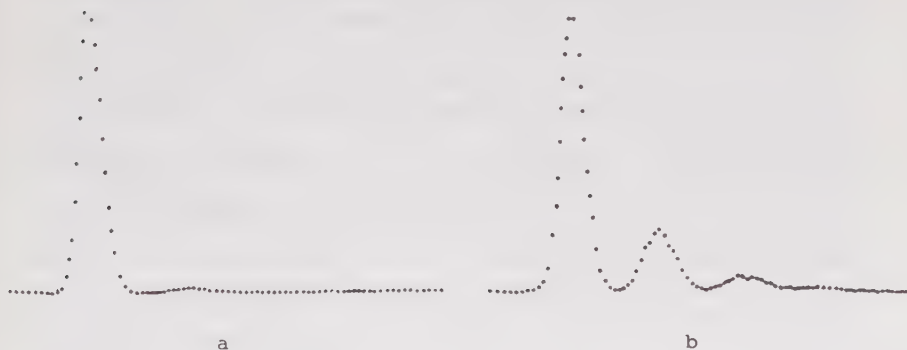


Abb. 1: Volumenverteilung der Erythrozyten in den Meßproben eines gesunden Nichtraucher (a) und eines Patienten mit koronarer Herzerkrankung (b). Auf der x-Achse ist das Volumen aufgetragen, auf der y-Achse die Häufigkeit; die einzelnen Gipfel entsprechen - von links nach rechts - den Einzelerythrozyten sowie Zweier- bzw. Dreier-Aggregaten. In der Probe des KHK-Patienten ist die Aggregation wesentlich ausgeprägter.

Die Aussagekraft des AW im Hinblick auf ein kardiovaskuläres Risiko wurde bisher nur in Querschnittsuntersuchungen an ausgewählten Kollektiven untersucht. Eine prospektive Evaluierung steht noch aus.

Die vorliegende Arbeit besteht aus einem epidemiologischen und einem experimentellen Teil. Im epidemiologischen Teil, der im Rahmen einer Herz-Kreislauf-Studie der Weltgesundheitsorganisation (MONICA-Projekt Augsburg) durchgeführt werden konnte und auch als Pilotstudie für eine geplante prospektive Untersuchung diente, wurden die Beziehungen zwischen dem AW und kardiovaskulären Risikofaktoren erstmals an einer Stichprobe aus der Bevölkerung untersucht. Im experimentellen Teil der Arbeit wurden Versuche zum Mechanismus der Erythrozyten-Aggregation durchgeführt. Ein besseres Verständnis der Faktoren, die die gesteigerte Erythrozyten-Aggregation bei atherosklerotischen Erkrankungen verursachen, könnte langfristig zur Entwicklung eines Tests mit höherer Spezifität und Sensitivität sowie geringerem apparativem und zeitlichem Aufwand führen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Definition und Bestimmungsmethode des Erythrozyten-Aggregationswertes (AW)

2.1.1. Prinzip der elektronischen Partikelvolumenmessung nach COULTER

Die AW-Bestimmung beruht auf der 1953 von COULTER [18] zuerst beschriebenen elektronischen Methode zur Messung der Anzahl und des Volumens mikroskopisch kleiner, in Flüssigkeit suspendierter Partikel. Dieses Verfahren setzt voraus, daß sich die zu messenden Partikel und das Suspensionsmedium in ihren spezifischen elektrischen Leitfähigkeiten unterscheiden, was u.a. für Suspensionen von Zellen in Elektrolytlösungen zutrifft.

In Abbildung 2 ist eine nach dem COULTER-Prinzip arbeitende Apparatur schematisch dargestellt. Das Kernstück ist eine feine Kapillare, die sogenannte Meßöffnung (MÖ), die zwei mit einem Elektrolyten gefüllte Kompartimente verbindet, welche ansonsten elektrisch und strömungsmechanisch voneinander getrennt sind. Die Suspension mit den zu messenden Partikeln strömt infolge eines Druckgefälles von einem Kompartiment durch die Messöffnung in das andere. Durch sehr niedrige Partikelkonzentration wird die Wahrscheinlichkeit, daß sich mehrere Partikel gleichzeitig in der Messöffnung befinden (Koinzidenz), stark reduziert, so daß die Partikel nacheinander und einzeln (sozusagen "im Gänsemarsch") durchtreten. Gleichzeitig fließt über zwei in den beiden Kompartimenten angeordnete Elektroden ein konstanter (eingeppräg-

ter) Gleichstrom durch die Messöffnung. Der Gesamtwiderstand des Stromkreises wird hauptsächlich durch den Widerstand der Messöffnung bestimmt. Beim Durchtritt eines Partikels, das schlechter leitet als das Suspensionsmedium, kommt es zu einem impulsartigen Anstieg des Widerstandes der Messöffnung, dessen Amplitude dem Volumen des Partikels proportional ist. Nach dem OHMschen Gesetz ($R = U/I$) hat diese Widerstandserhöhung bei konstanter Stromstärke einen direkt proportionalen Anstieg der zwischen den Elektroden gemessenen Spannung zur Folge. Die Amplitude dieses Spannungsimpulses ist demnach ein Maß für das Volumen des Partikels, wobei in den Proportionalitätsfaktor einige weitere Größen eingehen (siehe Abschnitt 2.1.2.).

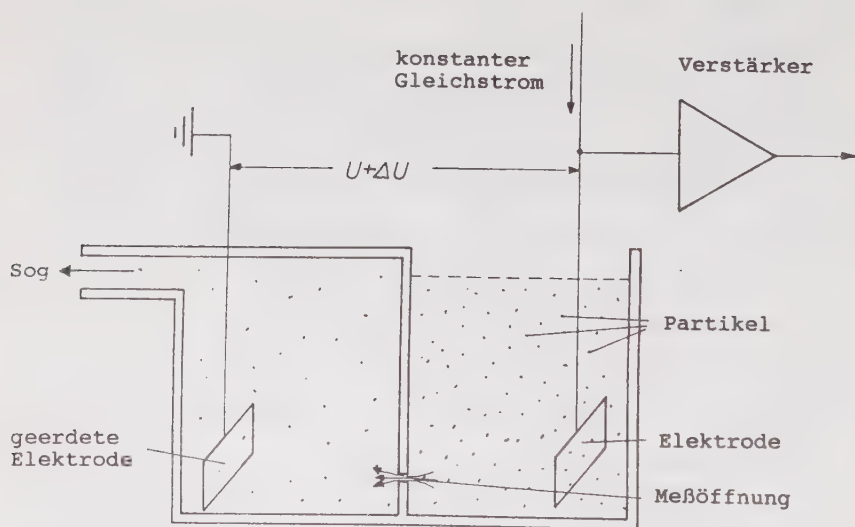


Abb. 2: Schematische Darstellung des COULTER-Prinzips.

Das Ausgangssignal kann, nach Verstärkung, zur Partikelzählung oder Partikelvolumenmessung ausgewertet werden. Die COULTER-Methode ermöglicht im Gegensatz zu manuellen Techniken die Untersuchung großer Zellzahlen in sehr kurzer Zeit (Tausende pro Sekunde) und läßt sich weitgehend automatisieren. Sie hat deshalb in Forschung und Medizin weite Verbreitung gefunden und gehört heute zur Routinemethodik bei der Zellzählung im hämatologischen Labor.

2.1.2. Meßtechnische Probleme der COULTER-Methode

2.1.2.1. Determinanten von Form und Amplitude des Meßimpulses

Amplitude und Form des Widerstands- bzw. Spannungsimpulses, den ein Partikel beim Durchtritt durch die Messöffnung erzeugt, werden nicht nur vom Volumen des Partikels bestimmt, sondern hängen auch von den spezifischen Leitfähigkeiten des Partikels und des Suspensionsmediums, von der Feldstärke, von Grösse und Form der Messöffnung und von der Form des Partikels ab. Bei nichtsphärischen Partikeln spielt auch die Orientierung eine Rolle. Bei deformierbaren Partikeln wird die Form von Partikeleigenschaften und hydrodynamischen Einflüssen bestimmt [41-45,60].

Bei Geräten, die nach dem ursprünglichen COULTER-Prinzip arbeiten, sind nicht alle Parameter, die neben dem Volumen des Partikels in den Meßimpuls eingehen, für alle gemessenen Partikel gleich. Auch wenn die Dimensionen der Meßöffnung (Richtwerte für zylindrische Öffnungen: Länge/Durchmesser

mindestens 1:1, aber Zunahme der Koinzidenzwahrscheinlichkeit mit der Länge; Öffnungsdurchmesser/Partikeldurchmesser mindestens 5:1, meist ca. 10:1, aber Verschlechterung des Verhältnisses zwischen Signal und Rauschen bei höheren Werten), die Stromstärke und die spezifische Leitfähigkeit des Suspensionsmediums optimiert und konstant gehalten werden, ist nur ein relativ kleiner zentraler Bereich der Meßöffnung hinsichtlich Feldstärke und hydrodynamischen Bedingungen homogen. Andererseits treten die Partikel auf den verschiedensten Bahnen durch die Meßöffnung.

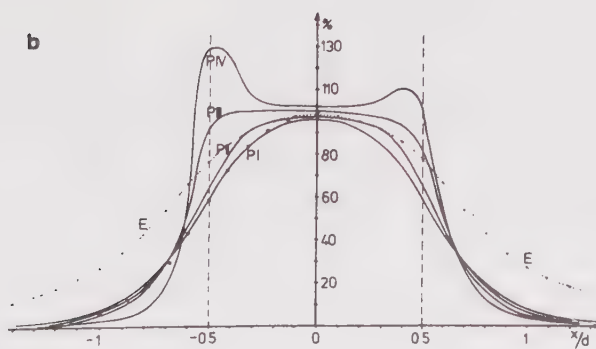
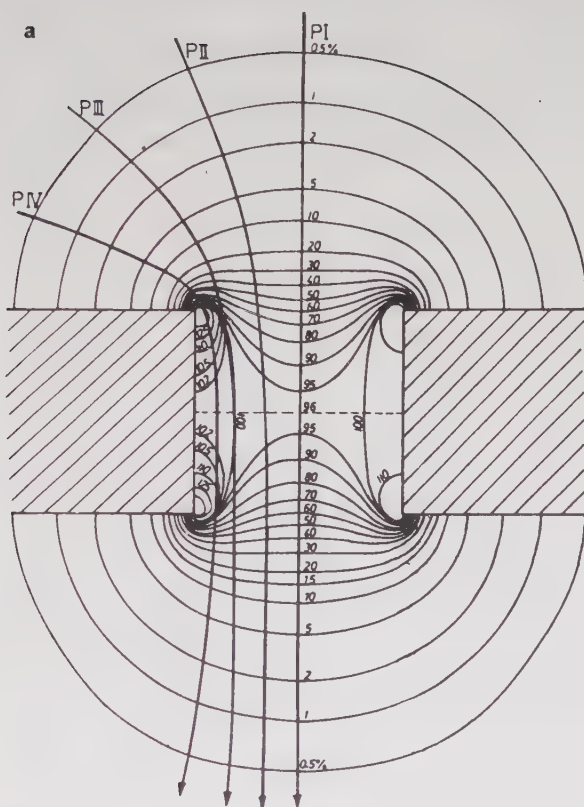
2.1.2.2. Einfluß der Durchtrittsbahn

Die Durchtrittsbahn eines Partikels hat, wie KACHEL und Mitarbeiter zeigen konnten [39], einen starken Einfluß auf Form und Amplitude des Meßimpulses. Abbildung 3 zeigt an einem Längsschnitt durch eine zylindrische Meßöffnung mit einem Länge/Durchmesser-Verhältnis von 1:1 die Feldstärke-Verteilung und die von gleichen Partikeln auf verschiedenen Durchtrittsbahnen erzeugten Impulse.

Abb. 3: a) Impulshöhenverteilung in einer zylindrischen Meßöffnung (Durchmesser = Länge; Querschnitt) und Beispiele für verschiedene Durchtrittsbahnen (PI-PIV).

b) Abhängigkeit von Form und Amplitude des Meßimpulses von der Durchtrittsbahn.

(nach KACHEL [41])



Auf peripheren Bahnen wird das Partikelvolumen im Vergleich zu achsennahen Bahnen überbewertet und zwar umso mehr, je größer die Abweichung von der Achse ist. Hierbei spielen elektrische und hydrodynamische Faktoren eine Rolle. In unmittelbarer Nähe der Wand ist auch in einem vollkommen homogenen Feld die durch ein Partikel bewirkte Feldänderung ausgeprägter als in wandfernen Bereichen (sog. Randeffect; die Feldlinien können sozusagen schlechter "ausweichen"). Außerdem befinden sich an den beiden Enden der Meßöffnung (Eintritts- und Austrittsbereich) an den Rändern Zonen mit höherer Feldstärke, weshalb Partikel auf peripheren Bahnen M-förmige Impulse erzeugen (mit größerer maximaler Amplitude als die auf zentraler Bahn erzeugten Impulse vergleichbarer Partikel). Hydrodynamisch zeichnen sich periphere Bahnen durch Scherkräfte infolge des in Wandnähe inhomogenen Geschwindigkeitsprofils der Flüssigkeit aus. Dadurch kommt es bei nichtsphärischen Partikeln zu unterschiedlichen Orientierungen bis hin zur Rotation. Deformierbare Partikel nehmen je nach den einwirkenden Kräften unterschiedliche Formen und Orientierungen an. Insbesondere gilt dies für native Erythrozyten infolge ihrer im Ruhezustand scheibenförmigen Gestalt und ihrer hohen Flexibilität.

Aufgrund der Abhängigkeit wichtiger Parameter von der Durchtrittsbahn können Partikel mit gleichem Volumen auf unterschiedlichen Bahnen Impulse unterschiedlicher Form und Amplitude erzeugen und umgekehrt können Impulse mit gleicher Amplitude von Partikeln mit unterschiedlichem Volumen stammen. Infolgedessen ist die quantitative Auswertung der Im-

pulse bei der konventionellen COULTER-Methode fehlerbehaftet. Die Überbewertung von Partikeln auf peripheren Bahnen führt zu einer rechtsschiefen Verzerrung von Volumenverteilungskurven [94,95]. In Abbildung 4 ist dies am Beispiel der Volumenverteilung von Erythrozyten veranschaulicht.

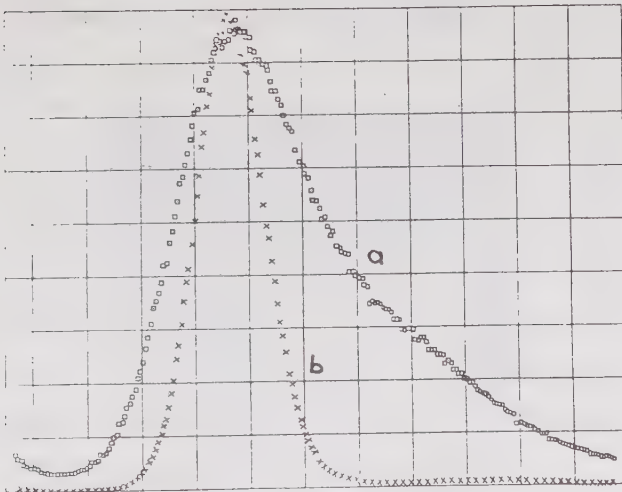


Abb. 4: Volumenverteilungskurven nativer Erythrozyten.
 a) gemessen mit konventioneller COULTER-Apparatur:
 deutliche Rechtsschiefe
 b) gemessen mit hydrodynamischer Fokussierung:
 symmetrische Verteilung

(aus THOM und KACHEL [95])

2.1.3. Verbesserte COULTER-Methode mit hydrodynamischer Fokussierung nach KACHEL

KACHEL und Mitarbeiter entwickelten eine Modifikation des COULTER-Verfahrens, bei der der Partikelstrom hydrodynamisch auf eine achsennahe Durchtrittsbahn fokussiert wird [41,44,45]. Dabei passieren alle Partikel eine elektrisch und hydrodynamisch homogene Zone in der Mitte der Meßöffnung, wo die maximale Amplitude des Impulses erreicht wird. Nur unter dieser Bedingung gilt für alle Partikel der gleiche Proportionalitätsfaktor zwischen Volumen und Impulsamplitude, so daß alle Partikel gleichen Volumens Impulse gleicher Amplitude erzeugen und umgekehrt Impulse gleicher Amplitude Partikel gleichen Volumens repräsentieren. Dadurch wird die apparativ bedingte Rechtsschiefe der Volumenverteilung beseitigt (vgl. Abbildung 4), was eine Voraussetzung für die Untersuchung der Aggregation von Erythrozyten anhand ihrer Volumenverteilung ist. Außerdem können bei fokussiertem Partikelstrahl kurze Meßöffnungen mit quadratischem Längsschnitt verwendet werden, da das elektrische Feld nicht in der gesamten Meßöffnung homogen sein muß. Verkürzung der Meßöffnung bedeutet Verringerung der Koinzidenzrate bei konstanter Partikeldurchflußrate bzw. ermöglicht bei gegebener maximal zulässiger Koinzidenzrate eine höhere Partikelrate und damit eine Verkürzung der Meßdauer.

Das verbesserte COULTER-Verfahren mit hydrodynamischer Fokussierung ist Grundlage des von KACHEL et al. entwickelten "Metricell"-Gerätes, mit dem eine exakte Aufnahme von Volumenverteilungen und somit eine Messung der Erythrozyten-Aggregation möglich ist.

2.1.4. Die Meßapparatur für die AW-Bestimmung

Der Meßplatz für die AW-Bestimmung ist in Abbildung 5 dargestellt. Das untere Gehäuse enthält das Metricell-Gerät mit dem eigentlichen Meßsystem und dem nachgeschalteten Verstärker. Darüber ist die ebenfalls von KACHEL und Mitarbeitern entwickelte [40] mikroprozessorgesteuerte Auswertungseinheit Cytomic 12 zu sehen.

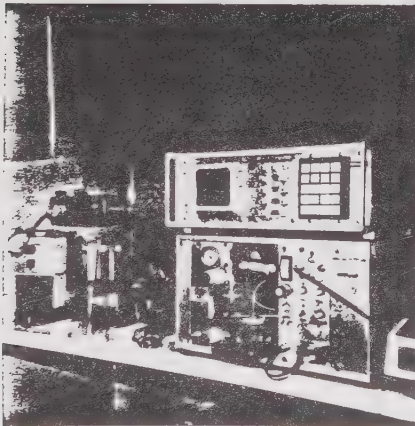


Abb. 5: Die Meßapparatur für die AW-Bestimmung.

2.1.4.1. Meßeinheit (Metricell)

Das Flüssigkeitssystem des Metricell ist in Abbildung 6 im Querschnitt dargestellt. Aus einem Vorratsbehälter fließt partikelfreie Elektrolytlösung (der sogenannte Hüllstrom-elektrolyt; vgl. Abschnitt 2.1.6.1.) über eine höhenverstellbare Regulierkammer in die Oberkammer und von dort unter dem an der Unterkammer anliegenden Sog durch die Meßöffnung. Die Partikelsuspension wird aus dem auf den Einfüllkonus aufgesteckten Probenbehälter (Pipettenspitze) durch die Zentralstrahlkapillare (konisch zugespitzte Glaskapillare; Mündungsdurchmesser ca. 100 μm ; Mündung auf die Längsachse der Meßöffnung zentriert) ca. 2 mm vor der Meßöffnung in den Elektrolytstrom injiziert, von diesem zu einem feinen Strahl gebündelt und auf einer zentralen Bahn durch die Meßöffnung transportiert. Nach dem Prinzip der kommunizierenden Röhren kann der hydrostatische Druck in der Zentralstrahlkapillare und damit die Partikeldurchflußrate durch Höhenverstellung der Regulierkammer eingestellt werden. In der Regulierkammer wird das Flüssigkeitsniveau durch ein Schwimmerventil konstant gehalten. Die Elektrolytzufuhr erfolgt tropfend, um das Meßsystem elektrisch vom Vorratsbehälter zu isolieren. Aus der Unterkammer fließt die Flüssigkeit in einen Abwasserbehälter. Das Meßsystem kann leicht demontiert werden. Durch Austausch der Trennwand zwischen Ober- und Unterkammer, in der sich die Meßöffnung befindet, ist ein rascher Wechsel zwischen Meßöffnungen verschiedener Größe möglich. Für die AW-Messung wird eine zylindrische Meßöffnung mit einem Durchmesser und einer Länge von je 80 μm verwendet. Die Elektroden befinden sich am Boden der Unterkammer bzw.

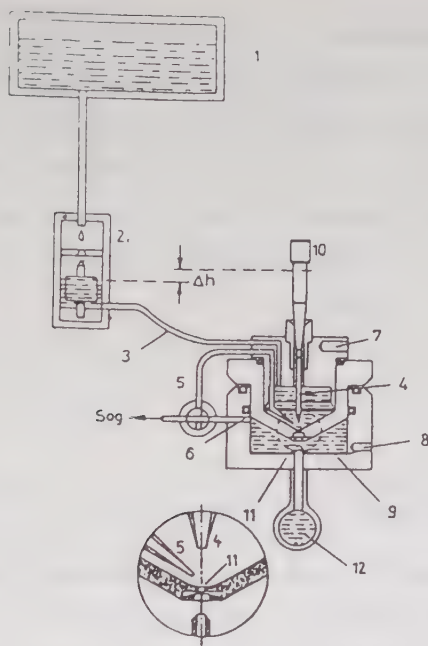


Abb. 6: Querschnitt durch das Flüssigkeitssystem des Metricell-Gerätes.

- 1) Vorratsbehälter mit Hüllstromelektrolyt.
- 2) Regulierkammer mit Schwimmerventil
- 3) Elektrolytzufuhr zur Oberkammer
- 4) Zentralstrahlkapillare
- 5) Absaugeinrichtung zur Reinigung der Oberkammer
- 6) Absaugeinrichtung für die Unterkammer zur Erzeugung des Elektrolytstromes durch die Meßöffnung
- 7) Anschluß für die Oberkammer-Elektrode (= Oberkammerdeckel)
- 8) Anschluß für die Unterkammer-Elektrode
- 9) Unterkammer-Elektrode
- 10) Probenbehälter (Pipettenspitze)
- 11) Meßöffnung
- 12) Gummibällchen zur Spülung der Meßöffnung von unten

(aus OTTL [67]).

im Deckel der Oberkammer. Eingebaute Spülvorrichtungen dienen der Reinigung und Störungsbeseitigung.

Die spezifischen Leitfähigkeiten von Suspensionsmedium und Hüllstromelektrolyt müssen gleich sein, da es sonst zu elektrischen Störungen (Rauschen) kommt. Für Messungen an Zellen muß das Suspensionsmedium in pH und Osmolalität physiologisch sein (vgl. Abschnitt 2.1.6.).

Die von den Elektroden registrierten Impulse werden verstärkt und zur Auswertungseinheit weitergeleitet.

2.1.4.2. Auswertungseinheit (Cytomic 12)

In der mikroprozessorgesteuerten Auswertungseinheit Cytomic 12 sind folgende Funktionen zusammengefaßt: Oszilloskop, Impulshöhenanalysator, Speicher für bis zu 74 Histogramme mit je 128 Kanälen und Computer mit fest eingebauten Programmen zur Datenauswertung. Der Impulshöhenanalysator ordnet jeden Impuls entsprechend seiner Amplitude einem Kanal im Histogrammspeicher zu (Analog-Digital-Wandlung) und erhöht den in diesem Kanal gespeicherten Zahlenwert um 1. Die Auflösung in 128 Kanäle genügt völlig zur sicheren Unterscheidung der verschiedenen Gipfel in der Volumenverteilungskurve der Erythrozyten. Die 74 Kanalgruppen für die Histogrammspeicherung reichen bei drei Teilmessungen je Probe (siehe Abschnitt 2.1.5.4.) und unter Berücksichtigung von Eich- und Kontrollmessungen für mehr als 20 Proben aus. Auswertung und Dokumentation können somit zeitlich getrennt von der Messung vorgenommen werden.

Die aktuellen Meßimpulse und das entstehende Histogramm werden auf dem eingebauten Oszilloskop dargestellt. Die Histogramme können auf einem Matrixdrucker ausgedruckt werden. Weitere Funktionen des Cytomic 12 wie z.B. Datentransfer von und zu externen Speichermedien (Diskette, Magnetband) sind bei dem zur AW-Messung verwendeten Aufbau (noch) nicht realisiert.

2.1.5. AW-Bestimmung

Die AW-Bestimmung wurde im Prinzip nach dem von BOSS ausgearbeiteten [8-11] und von WIETELMANN modifizierten [102] Verfahren durchgeführt, das auch PORZ [71,72] und OTTL [67] anwandten. Leichte Abweichungen betrafen einen Pipettierschritt (vgl. Abschnitt 2.1.9.) sowie bei einem Teil der Messungen die Blutabnahme und -aufbereitung (vgl. Abschnitt 2.2.4.3.).

2.1.5.1. Untersuchungsmaterial

Für die AW-Bestimmung wird venöses Blut mit Ethylen-dinitriolo-tetraessigsäure (EDTA) als Antikoagulans verwendet. Durch Zugabe des Proteasen-Inhibitors Aprotinin soll eine mögliche Proteolyse in vitro während des Transports und der Aufarbeitung der Proben verhindert werden. Aprotinin selbst beeinträchtigt die AW-Bestimmung nicht [10]. Da 1,5 ml Plasma benötigt werden, sollten bei unbekanntem Hämatokrit mindestens 5 ml EDTA-Blut zur Verfügung stehen.

2.1.5.2. Blutabnahme

Die Blutabnahme wird im Normalfall am sitzenden Probanden durchgeführt. Nach möglichst kurzer Stauung werden aus einer Kubitalvene 10 ml Blut direkt und freifließend in ein mit K_2 -EDTA beschichtetes Polystyrol-Röhrchen abgenommen (Fa. Greiner, Nürtingen; Artikel-Nr. 160136; 16/100 mm, 10 ml), dem zuvor 100 μ l Trasylol^R (Fa. Bayer, Leverkusen; Lösung mit 2,8 mg Aprotinin/ml = 20000 Kallikrein-Inhibitor-Einheiten (KIE)/ml) zugegeben worden sind. Je nach Venenverhältnissen wird mit einer 20G-Kanüle (Nr. 1, Außendurchmesser 0,9 mm) oder einer 21G/0,8 mm-Kanüle (Nr. 2) punktiert, wobei die Kanüle durch einen Adapterstopfen mit dem Röhrchen verbunden ist. Unmittelbar nach der Blutentnahme wird das Röhrchen verschlossen und dreimal gewendet, um eine vollständige Vermischung des Blutes mit dem Antikoagulans und dem Proteasen-Inhibitor sicherzustellen. Die EDTA-Konzentration beträgt bei 10 ml Füllvolumen ca. 2,0 mg/ml bzw. 4,9 mmol/l, die Aprotinin-Konzentration 28 μ g/ml bzw. 200 KIE/ml.

Zur Abnahme größerer Blutmengen für In-vitro-Versuche (20-150 ml) wurde ein "Butterfly"-Perfusionsbesteck (Venofix^R, Fa. Braun-Melsungen, Melsungen; Artikel-Nr. 404710; 19G/1,1 mm-Kanüle) verwendet und das Blut durch den Schlauch in die Röhrchen geleitet. Für einige Versuche wurde zusätzlich Serum gewonnen, wozu Blut in Glasröhrchen ohne Aprotinin-Zugabe abgenommen wurde.

Bei den AW-Messungen im Rahmen des MONICA-Projektes Augsburg mußte aus technischen Gründen leicht vom Standardverfahren abgewichen werden (vgl. Abschnitt 2.2.4.3.).

2.1.5.3. Aufbereitung der Blutproben

Alle Arbeitsschritte werden bei Raumtemperatur ($20-24^{\circ}\text{C}$) und baldmöglichst nach der Blutabnahme durchgeführt.

Vom EDTA-Blut wird, nach Resuspension durch dreimaliges Wenden des Röhrchens, eine Vollblutprobe von 0,5 ml in ein 1,5 ml-Reagiergefäß aus Polypropylen (Plastibrand^R, Fa. Brand, Wertheim; Artikel-Nr. 780500) pipettiert. Das restliche EDTA-Blut wird zur Gewinnung von Plasma zentrifugiert. Dies geschieht normalerweise in einer Laborzentrifuge (Minifuge^R 2, Fa. Heraeus-Christ, Osterrode am Harz; Artikel-Nr. 4123) mit Schwenkbecherrotor (Artikel-Nr. 3350) bei einer Umdrehungsfrequenz von 4500 min^{-1} für 10 min mit ungebremstem Auslauf. Die relative Zentrifugalbeschleunigung (RZB) beträgt ca. $2300\times g$ (in Röhrchenmitte). Bei den AW-Messungen im Rahmen des MONICA-Projektes Augsburg wurde stattdessen eine leichter transportable Tischzentrifuge benutzt (vgl. Abschnitt 2.2.4.3.).

Das nach der Zentrifugation im Überstand befindliche plättchenarme Plasma (platelet poor plasma, PPP) wird vorsichtig in 1,5 ml fassende Reagiergefäße abpipettiert. Bei größeren Blutmengen eines Spenders für In-Vitro-Versuche wird das Plasma der verschiedenen Röhrchen zunächst in einem Mehrzweckgefäß aus Polystyrol (Fa. Greiner, Nürtingen; Artikel-Nr. 205111; 26/64 mm, 35 ml) gepoolt. Bei größeren Zeitabständen zwischen Plasmagewinnung und AW-Messung bzw. Weiterverarbeitung wird das Plasma grundsätzlich so lange wie möglich vereinigt aufbewahrt.

2.1.5.4. Ablauf der AW-Messung

Der Ablauf der AW-Messung ist in Abb. 7 schematisch dargestellt. 1,5 ml plättchenarmes EDTA-Plasma werden mit einer 500 µl-Kolbenhubpipette (Typ 3130, Fa. Eppendorf, Hamburg) in ein 1,5 ml fassendes Reagiergefäß aus Polypropylen (Plastibrand^R, Fa. Brand, Wertheim; Artikel-Nr. 780500) pipettiert. Anschließend werden mit einer 5 µl-Kolbenhubpipette (Typ 3130, Fa. Eppendorf, Hamburg) aus der vor der Zentrifugation abgenommenen autologen Vollblutprobe, nach Resuspension durch dreimaliges Wenden, 5 µl des EDTA-Vollblutes zu der Plasmaprobe gegeben. Dabei wird die Pipettenspitze vor dem Eintauchen in die Plasmaprobe außen vorsichtig abgewischt und nach der Entleerung einmal mit Plasma nachgespült. Die so hergestellte Erythrozytensuspension stellt eine 1:300-Verdünnung des Vollblutes mit autologem Plasma dar, d.h. sie enthält bei normalem Blutbild ($4-6 \cdot 10^6$ Erythrozyten/µl) rechnerisch 13000-20000 Erythrozyten/µl. Nach BOSS [10] kann der Hämatokrit des Nativblutes infolge der starken Verdünnung bei der AW-Bestimmung vernachlässigt werden.

Falls eine Messung keine befriedigende Volumenverteilungskurve liefert (z.B. teilweise aufgefüllte Täler), wird sie mit filtriertem Plasma wiederholt. Dazu wird Plasma mit einer Einmalspritze durch ein gekapseltes Membranfilter mit 0,45 µm Porengröße gedrückt (Acrodisc^R, Fa. Gelman Sciences, Ann Arbor, Michigan, USA; Produkt-Nr. 4217).

Das Reagiergefäß wird anschließend in einer Rotationsapparatur (Eigenbau, MPI für Biochemie, unter Verwendung eines Rührwerkantriebs, Typ RW 18, Fa. Janke & Kunkel, Staufen i. Breisgau) nacheinander für je 5 min mit Umdrehungsfrequenzen

BESTIMMUNG DER ERYTHROZYTEN-AGGREGATION

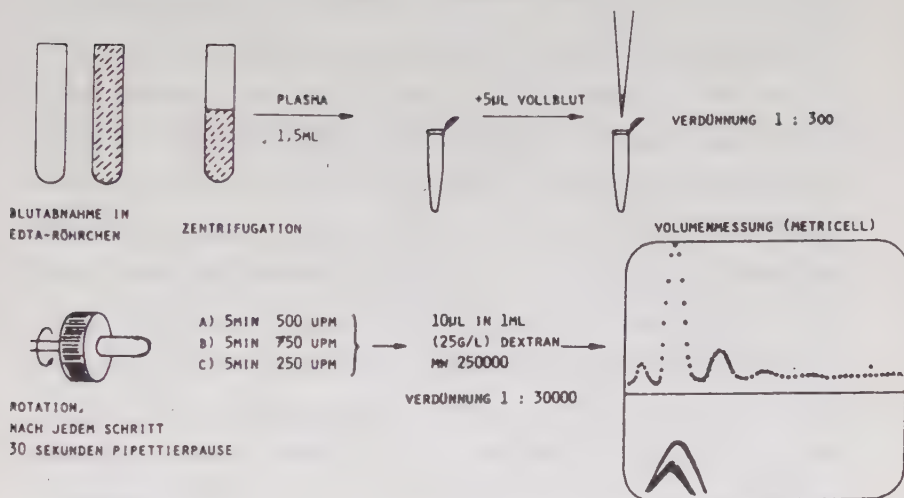


Abb. 7: Ablauf der AW-Messung.

UPM = Umdrehungen pro Minute.

MW = Molekulargewicht.

von 500 min^{-1} , 750 min^{-1} und 250 min^{-1} in horizontaler Lage um seine Längsachse rotiert, um die Erythrozytensuspension definierten Scherkräften auszusetzen. Zwischen den einzelnen Rotationsschritten wird die Rotation jeweils für 30 Sekunden unterbrochen. Unmittelbar nach dem Anhalten werden mit einer 10 µl -Kolbenhubpipette (Typ 3130, Fa. Eppendorf, Hamburg) 10 µl der Probe entnommen und sofort in ein $1,5 \text{ ml}$ -Reagiergefäß mit 1000 µl einer $2,5 \text{ ‰}$ igen (25 g/l) Lösung von hochmolekularem Dextran (mittleres Molekulargewicht 250000 d) in ge-

pufferter isotoner Elektrolytlösung (vgl. Abschnitt 2.1.6.2.) pipettiert (Pipettenspitze: Tipac C20/TJ, Fa. Gilson, Villiers Le Bel, Frankreich, Artikel-Nr. 23810). Dabei wird die Pipettenspitze nicht vor- bzw. nachgespült. Nach dieser erneuten 100fachen Verdünnung beträgt das Gesamtverdünnungsverhältnis im Vergleich zum Vollblut ca. 1:30000 und die so erhaltene eigentliche Messprobe enthält rechnerisch nur noch ca. 130-200 Erythrozyten/ μ l. Bei einer derart niedrigen Erythrozytenkonzentration kommt es auch in Gegenwart des stark aggregationsfördernden [14,16] hochmolekularen Dextrans nicht zu einer nennenswerten Bildung von neuen oder einer Vergrößerung von bestehenden Erythrozytenaggregaten; vielmehr stabilisiert das Dextran die bestehenden Aggregate, so daß die anschließende Bestimmung der Volumenverteilung nicht durch vorzeitige Deaggregation verfälscht wird. Der während der Rotation eingestellte Gleichgewichtszustand zwischen der Neubildung von Aggregaten infolge von aggregationsfördernden Eigenschaften des Plasmas und der Erythrozyten einerseits und der Zerreißung von Aggregaten infolge der einwirkenden Scherkräfte andererseits wird gewissermaßen "eingefroren" [66].

Der Inhalt der Messprobe wird sofort mit einer "Motorpipette" (umgebauter Dilutor, Typ 5213, mit 1000 μ l-Einsatz; Fa. Eppendorf, Hamburg) mit einer konstanten Pipettiergeschwindigkeit von ca. 0,5 ml/s in eine Pipettenspitze (Tipac C200/TB, Fa. Gilson, Villiers Le Bel, Frankreich; Artikel-Nr. 23818) aufgezogen und diese anschließend in den Einfüllkonus der Meßkammer des Metricell gesteckt (vgl. Abb.5 und 6). Die Automatisierung dieses letzten Pipettierschritts

stellt eine Verbesserung der früheren manuellen Methode dar (vgl. Abschnitt 2.1.9.).

Wenige Sekunden nach dem Aufsetzen der Probe passieren infolge des bei betriebsbereitem Gerät ständig anliegenden Soges die ersten Zellen die Meßöffnung. Wenn die Impulse auf dem Oszilloskop eine Störung erkennen lassen, wird diese zunächst beseitigt, anderenfalls wird die Histogrammspeicherung gestartet. Gegebenenfalls wird durch Höhenverstellung der Regulierkammer die Partikeldurchflußrate korrigiert, die etwa 500 Partikel/s (maximal 1000 Partikel/s) betragen soll. Sie wird auf dem Oszilloskop auf einer Skala angezeigt. Der Meßstrom beträgt 0,6 mA, die Druckdifferenz (Sog) an der Meßöffnung $2,5 \text{ kp/cm}^2$ (=ca. 25 kPa). Bei der zur AW-Messung verwendeten Meßloch (Durchmesser = Länge = 80 μm) ergibt sich daraus eine Durchflußrate von ca. 25 $\mu\text{l/s}$ (partikelfreier Hüllstrom + Partikelsuspension im Zentralstrahl) und eine mittlere Durchflußgeschwindigkeit von ca. 5 m/s [41].

Während der Bestimmung der Volumenverteilung der Erythrozyten der ersten Teilprobe läuft gleichzeitig der zweite Rotationsschritt und während der zweiten Teilmessung der dritte Rotationsschritt. Die Auswertungseinheit wird in der Regel so eingestellt, daß die Histogrammspeicherung automatisch beendet wird, sobald in einem Kanal 3200 Impulse gespeichert sind. Je nach Ausmaß der Aggregation dauert die Messung zwischen 30 Sekunden und mehreren Minuten. Bei ausgeprägter Aggregation wird wegen der breiten Verteilung in keinem der Kanäle die Abschaltgrenze erreicht. In diesem Fall muß die Speicherung rechtzeitig manuell beendet werden, spätestens wenn die Probe ganz durchgelaufen oder der nächste Rotati-

onsschritt beendet ist.

Die Impulse werden auf dem Oszilloskop ständig beobachtet; beim Auftreten einer Störung wird die Histogrammspeicherung sofort unterbrochen. Die meisten Störungen lassen sich mittels eingebauter Spülmechanismen schnell beseitigen, so daß die Messung anschließend fortgesetzt werden kann. Auch wenn eine Probe aufgrund von größeren Störungen oder aus Zeitgründen nur teilweise für die Histogrammspeicherung ausgewertet werden kann, wird fast immer eine brauchbare, auf den Meßwerten einiger tausend bis zigtausend Erythrozyten(-Aggregate) basierende Volumenverteilung erhalten.

Nach dem manuellen oder automatischen Abschalten der Histogrammspeicherung wird die Pipettenspitze abgenommen und weggeworfen und die Meßkammer mit dem eingebauten Spülmechanismus von Resten der Probe befreit. Die Auswertungseinheit wird auf die nächsthöhere Kanalgruppe geschaltet. Anschließend ist das Gerät bereit für die nächste Messung.

Die Messung einer Probe (drei Teilmessungen) dauert insgesamt etwa 20 Minuten.

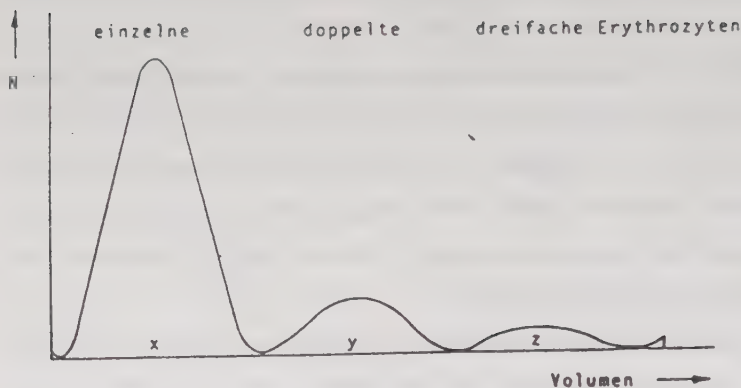
2.1.5.5. Berechnung des AW

Für jeden der drei Rotationsschritte wird aus der gespeicherten Volumenverteilung der zugehörigen Meßprobe der Anteil der aggregierten Erythrozyten an der Gesamtzahl der gemessenen Erythrozyten ermittelt. Unter den oben beschriebenen standardisierten Bedingungen der AW-Messung treten neben den einzelnen Erythrozyten hauptsächlich Zweier- und Dreier-Aggregate auf. Größere Aggregate, die nur bei sehr starker Aggregation beobachtet werden und deren Verteilung bei

der üblichen Spreizung des Volumenspektrums nicht mehr ausreichend aufgelöst wird (der höchste Kanal enthält alle nicht aufgelösten, "zu großen" Impulse), werden bei der Berechnung als Dreier-Aggregate behandelt. Die dadurch bedingte leichte Unterschätzung des AW bei ohnehin sehr hohen Werten ist vernachlässigbar. Die von den Leukozyten erzeugten Impulse täuschen Erythrozyten-Aggregate vor, fallen aber zahlenmäßig nicht ins Gewicht (theoretisch: 1 Leukozyt = 3 (aggregierte) Erythrozyten).

Die Berechnung des Anteils der aggregierten Erythrozyten erfolgt automatisch durch ein im Cytomic 12 gespeichertes Programm nach einer von WIETELMANN erarbeiteten Formel [102] (vgl. Abb. 8).

Dabei wird für jeden der drei Gipfel der Volumenverteilung die Gesamtzahl der Impulse aus den Häufigkeiten in den zum jeweiligen Gipfel gehörenden Kanälen ermittelt und daraus durch Multiplikation mit der Zahl der Erythrozyten pro Impuls die Gesamtzahl der Erythrozyten dieses Gipfels berechnet. Es müssen lediglich die in Abhängigkeit vom mittlerem Erythrozytenvolumen von Fall zu Fall in verschiedenen Kanälen liegenden Grenzen zwischen den Gipfeln manuell eingegeben werden, was durch vier verschiebbare Marker in der auf dem Oszilloskop dargestellten Verteilungskurve geschieht: 1) Abgrenzung der Einzel-Erythrozyten gegen kleinere Partikel (Thrombozyten, Zelldebris, Staubeilchen, Luftbläschen); 2) Grenze zwischen Einzel-Erythrozyten und Zweier-Aggregaten; 3) Grenze zwischen Zweier- und Dreier-Aggregaten; 4) obere Grenze des Volumenspektrums (Kanal 127, konstant).



$$\text{Anteil der aggregierten Erythrozyten} = \frac{2y + 3z}{x + 2y + 3z} \cdot 100 \quad [\%]$$

wobei

x = Anzahl der Einzel-Erythrozyten

y = Anzahl der Aggregate von je zwei Erythrozyten

z = Anzahl der Aggregate von je drei oder mehr Erythrozyten

Abb. 8: Berechnung des Anteils der aggregierten Erythrozyten an der Gesamtzahl der gemessenen Erythrozyten aus der Volumenverteilungskurve.

Aus den Einzelwerten für die drei Rotationsschritte wird der AW nach folgender Formel berechnet (BOSS [10]):

$$AW = \frac{a + 2b + c}{4} \quad [\%]$$

wobei

a = Anteil der aggregierten Erythrozyten bei 500 min⁻¹

b = Anteil der aggregierten Erythrozyten bei 750 min⁻¹

c = Anteil der aggregierten Erythrozyten bei 250 min⁻¹

PORZ [71,72] fand, daß der AW einer Blutprobe mit zunehmendem Zeitabstand von der Blutentnahme abfällt. Da die Messung jedoch nicht immer zum gleichen Zeitpunkt nach der Blutabnahme durchgeführt werden kann, ist eine Umrechnung auf einen definierten Zeitpunkt notwendig, um vergleichbare Werte zu erhalten. Aus den zeitlichen Verlaufskurven von 89 Proben von gesunden Spendern und Patienten mit koronarer Herzerkrankung ermittelte PORZ folgende Regressionsgleichung für die Beziehung zwischen der Höhe des AW und dem Zeitabstand zur Blutabnahme:

$$AW_t = (100 - 0,08333 t) \cdot AW_0$$

wobei

t = Zeit zwischen Blutentnahme und AW-Messung in Minuten

AW_t = AW zur Zeit t

AW₀ = Anfangswert (hypothetisch, da Abfall in der ersten Stunde steiler)

Mit Hilfe dieser Gleichung läßt sich jeder zu einem beliebigen Zeitpunkt gemessene AW auf einen beliebigen anderen Zeitpunkt normieren. PORZ [71,72] und OTTL [67] wählten als Normierungspunkt 240 Minuten nach Blutentnahme, da dies bei ihren Untersuchungen die mittlere Zeitdauer bis zur AW-Messung war. Zu diesem Zeitpunkt ist der AW im Mittel auf 80,14 % seines hypothetischen Ausgangswertes abgefallen. Nach Umformung der Regressionsgleichung ergab sich folgende Normierungsformel:

$$AW_{240 \text{ min}} = \frac{AW_t}{100 - 0,08333 \cdot t} \cdot 80,14$$

Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurde dieses Normierungsverfahren in der vorliegenden Untersuchung übernommen.

Ein ähnlicher Abfall der Meßwerte mit zunehmendem Zeitabstand zwischen Blutentnahme und Messung wurde auch bei einem photometrischen Verfahren zur Bestimmung der Erythrozyten-Aggregation gefunden [19]. Das Phänomen scheint somit nicht methodenspezifisch, sondern durch die Natur der beteiligten Faktoren bedingt zu sein.

2.1.6. Herstellung der Lösungen

Es werden nur Reagenzien mit analytischem Reinheitsgrad verwendet. Alle Lösungen werden mit Aqua bidest. angesetzt. Alle Geräte werden nach den Vorschriften des Herstellers geeicht.

2.1.6.1. Tris/HCl/EDTA-Puffer (Probenpuffer)

Der Probenpuffer, der auch zur Herstellung des Suspensionsmediums verwendet wird, enthält 1,21 g/l (=10 mmol/l) Tris(hydroxymethyl)-amino-methan (kurz Tris), 0,1 g/l (=0,27 mmol/l) $\text{Na}_2\text{-EDTA}\cdot 2\text{ H}_2\text{O}$, 7,8 g/l (=134 mmol/l) NaCl, 1,0 g/l (=15 mmol/l) NaN_3 und 8,5 ml/l 1N HCl (=8,5 mmol/l). Der pH wird auf $7,40\pm 0,05$ eingestellt, die Osmolalität beträgt 285 ± 10 mosmol/kg und die spezifische Leitfähigkeit $14,3\pm 0,3$ mS/cm (20°C).

2.1.6.2. Suspensionsmedium (Dextranlösung)

Zur Herstellung der als Suspensionsmedium verwendeten Dextranlösung werden 25 g hochmolekulares Dextran (mittleres Molekulargewicht 250000 d; Typ T 250, Fa. Roth, Karlsruhe, Artikel-Nr. 9233) in 1 l des oben beschriebenen Probenpuffers gelöst. pH und Osmolalität ändern sich dadurch nicht meßbar; die spezifische Leitfähigkeit sinkt um etwa 1,0 mS/cm auf $13,3\pm 0,3$ mS/cm (20°C) ab.

Da die stabilisierende Wirkung des Dextrans auf die Erythrozyten-Aggregate mit ihrer aggregierenden Wirkung zusammenhängt, wird letztere in jedem neuen Ansatz und wiederholt während der Verwendungszeit eines Ansatzes überprüft. Dazu werden aus der 2,5 %igen Lösung Proben mit Konzentrationen von 0,5 %, 1,0 %, 1,5 %, 2,0 % und 2,5 % hergestellt und davon jeweils 1,5 ml in Reagiergefäße gefüllt. In diesen Proben wird mit Erythrozyten eines beliebigen Spenders der AW gemessen, ganz analog zur Messung in Plasma. Die Ergebnisse werden graphisch aufgetragen. Zeigt der AW nicht den typi-

schen steilen Anstieg zwischen 0,5 % und 1,5 % und das anschließende Plateau im Bereich von 2,0-2,5 %, so wird der Ansatz nicht (weiter) verwendet. Die Lösung wird neu angesetzt bzw. eine neue Dextran-Charge verwendet.

2.1.6.3. Hüllstromelektrolyt

Der Hüllstromelektrolyt muß, da er mit den Zellen nicht in Kontakt tritt, in pH und Osmolalität nicht physiologisch sein. Er muß allerdings die gleiche spezifische Leitfähigkeit wie das Suspensionsmedium haben (vgl. Abschnitt 2.1.4). Die Lösung wird mit 1,0 g/l (=15 mmol/l) NaN_3 , wodurch das Wachstum von Bakterien verhindert wird, und 7,6 g/l (=130 mmol/l) NaCl angesetzt und durch Zugabe von NaCl bzw. Aqua bidest. die Leitfähigkeit an die der verwendeten Dextranlösung angeglichen.

Die spezifischen Leitfähigkeiten der Dextranlösung und des Hüllstromelektrolyten werden regelmäßig kontrolliert. Gegebenenfalls wird der Hüllstromelektrolyt angeglichen.

Zur Entfernung von Staubpartikeln wird der Hüllstromelektrolyt beim Einfüllen in den Vorratsbehälter des Metricell durch ein Zellulosenitrat-Membranfilter mit einer Porengröße von 0,2 μm filtriert (Typ SM 11307 mit Glasfaser-Vorfilter Typ SM 13400, Fa. Sartorius, Göttingen). Zur Entfernung von Luftbläschen wird der Behälter nach dem Befüllen sowie zu Beginn jedes Tages mit der Wasserstrahlpumpe gründlich entgast.

2.1.6.4. Messung von pH, Osmolalität und Leitfähigkeit

pH

Für die pH-Messungen wurde ein Digital-pH-Meter (Typ 643-1, Fa. Knick, Berlin) mit automatischer Temperaturkompensation über ein angeschlossenes Widerstandsthermometer (Typ PT 100, Fa. Knick, Berlin) benützt.

Osmolalität

Die Osmolalität wurde nach dem Prinzip der Gefrierpunktserniedrigung ermittelt (Halbmikro-Osmometer Typ M, Fa. Knauer, Berlin; Artikel-Nr. 2120).

Leitfähigkeit

Die spezifische elektrische Leitfähigkeit wurde mit einem Digital-Konduktometer (Typ 600, Fa. Knick, Berlin) mit automatischer Temperaturkompensation über ein angeschlossenes Widerstandsthermometer (Typ PT 100, Fa. Knick, Berlin) gemessen (Bezugstemperatur = 20°C ; Temperaturkoeffizient = $2,3\text{ \%}/\text{K}$).

2.1.7. Eichung des Metricell-Gerätes

Da der AW kein Absolutwert ist, sondern ein aus der Volumenverteilung der Erythrozyten berechneter Prozentsatz, ist er gegenüber geringen Schwankungen der absoluten Meßwerte unempfindlich - vorausgesetzt, daß die Änderungen langsam ablaufen (Tagesgang, Tag-zu-Tag-Schwankung) und die Bedingun-

gen während einer Messung konstant sind. Eine Absolutwertzeichnung ist deshalb bei der AW-Bestimmung nicht erforderlich. Es wird dennoch angestrebt, die Meßbedingungen so konstant wie möglich zu halten.

Das Gerät wird täglich vor Beginn der Messungen überprüft. Ein von einem Impulsgenerator erzeugter Eichimpuls mit konstanter Amplitude wird zunächst zur Überprüfung des Impulshöhenanalysators direkt in die Auswertungseinheit eingespeist. Anschließend wird der Eichimpuls in Serie mit der Meßöffnung geschaltet und auf diese Weise indirekt der "Leerwiderstand" der Meßöffnung kontrolliert. Damit lassen sich Leitfähigkeitsänderungen des Hüllstromelektrolyten (z.B. infolge von Temperaturänderungen) und Verunreinigungen in der Meßöffnung erkennen. Diese Kontrollen werden während des Meßprogramms wiederholt durchgeführt.

Nach den elektrischen Tests wird eine Kontrollmessung mit glutaraldehyd-fixierten Erythrozyten in Elektrolytlösung, die als gut haltbare Referenzpartikel mit konstantem Volumen dienen, durchgeführt.

Mit den Erythrozyten jedes Probanden wird zunächst eine Messung in Puffer (vgl. Abschnitt 2.1.6.1.) durchgeführt, um die Volumenverteilung ohne Aggregationseffekte beurteilen zu können.

2.1.8. Reproduzierbarkeit der AW-Messung

WIETELMANN [102] fand bei unmittelbar aufeinanderfolgender Doppelbestimmung des AW aus der gleichen Rotationsprobe eine sehr gute Übereinstimmung der beiden Messungen (Korrelationskoeffizient=0,99, Steigung der Regressionsgeraden=1,01;

n=151). Bei zweifacher Bestimmung des AW innerhalb von 1-7 Stunden nach der Blutabnahme ergab sich ebenfalls eine enge Korrelation ($n=124$; $r=0,96$; Steigung=0,97). PORZ [71,72] ermittelte bei wiederholter, über einen ganzen Tag verteilter Bestimmung des AW einen Variationskoeffizienten von 0,1516 (ohne Zeitkorrektur) bzw. 0,1139 (mit Zeitkorrektur). In eigenen Versuchen im Zusammenhang mit einer Modifikation der Methode (vgl. Abschnitt 2.1.9.) lag der Variationskoeffizient bei jeweils mehreren Messungen aus derselben Rotationsprobe zwischen 0,05 und 0,10 ($n=5-10$).

2.1.9. Verbesserung der Methode

Während der Einarbeitung des Verfassers waren bei Vergleichsmessungen mit einem erfahrenen Untersucher (OTTL) zum Teil drastische Unterschiede in den an identischen Proben ermittelten Aggregationswerten aufgefallen. In einer eingehenden Untersuchung der einzelnen Arbeitsschritte wurde der letzte Pipettierschritt als kritisch erkannt, bei dem die eigentliche Meßprobe mit den in der Dextranlösung suspendierten Erythrozyten(-Aggregaten) mit einer 1000 μ l-Kolbenhubpipette (Typ 3130, Fa. Eppendorf, Hamburg) in eine Pipetenspitze aufgenommen wird (vgl. Abschnitt 2.1.5.4.). Je schneller die Probe aufgezogen wurde, desto niedriger waren die Werte. Auf diese Weise war es möglich, aus ein und derselben Rotationsprobe durch bewußt langsames oder schnelles Pipettieren ein weites Spektrum von Aggregationswerten über und unter dem "Normalwert" des erfahrenen Untersuchers zu erzeugen.

Mit einem improvisierten Pipettiergerät, dessen Schrittmotor

gigkeit des AW von der Pipettiergeschwindigkeit genauer untersucht werden. Abbildung 9 zeigt eine typische Kurve.

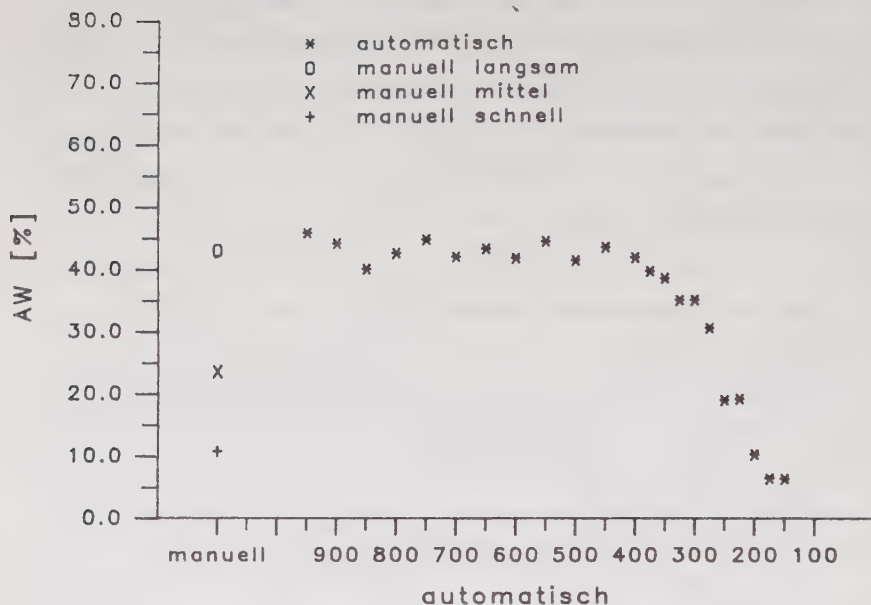


Abb. 9: Abhängigkeit des AW von der Pipettiergeschwindigkeit.

Die Zahlenwerte auf der x-Achse beziehen sich auf die Einstellung der Testapparatur: je niedriger der Wert, desto höher die Pipettiergeschwindigkeit (vgl. Text).

Offenbar treten in der Pipettenspitze mit zunehmender Pipettiergeschwindigkeit Scherkräfte auf, die ausreichend stark sind, um einen immer größeren Teil der vorhandenen Aggregate wieder auseinanderzureißen. Daß die AW-Bestimmung in den Händen aller früheren Untersucher eine befriedigende Reproduzierbarkeit gezeigt hat, liegt wohl an der auch ohne Kenntnis des Problems angestrebten und durch Routine erworbenen Gleichmäßigkeit in der Durchführung aller Arbeitsschritte, die einen sorgfältigen Untersucher auszeichnet.

Um den kritischen Arbeitsschritt von Untersuchereinflüssen zu befreien, wurde nach einer Möglichkeit gesucht, die Pipettiergeschwindigkeit konstant zu halten. Die Vergleichbarkeit der Werte mit früheren Untersuchungen sollte gewährleistet sein. Die zu entwickelnde Automatik-Pipette mußte demnach an dem erfahrenen Untersucher "geeicht" werden. Bei routinemäßigem Pipettieren wurde eine mittlere Pipettiergeschwindigkeit von ca. 0,5 ml/s festgestellt (gemessen wurde, mit der Stoppuhr, die Zeit, die für das Aufziehen der 1000 µl-Probe benötigt wird: ca. 2 Sekunden).

Versuche mit umgebauten manuellen Pipetten, bei denen die Kraft der Hubfeder verringert oder die Bewegung gedämpft wurde, brachten keine befriedigenden Ergebnisse. Schließlich stellte die Fa. Eppendorf, Hamburg, auf Anfrage einen auf die gewünschte Flußrate von 0,5 ml/s umgebauten Dilutor (Typ 5213) mit 1000 µl-Einsatz als Prototyp zur Verfügung. Vom Dilutor führt ein dünner Kunststoffschlauch in das Innere eines als Griff dienenden leeren Gehäuses einer manuellen Pipette und ist dort luftdicht mit dem Ansaugrohr der Pipette verbunden. Die Drucktaste am oberen Ende des Gehäuses be-

tätigt einen elektrischen Kontakt, mit dem der Dilutor gesteuert wird. Nach einmaligem Drücken der Taste saugt das Gerät 1000 μ l an und hält dann selbsttätig an. Die Pipettenspitze kann nun abgenommen und auf den Metricell aufgesetzt werden. Nach erneutem Drücken der Taste kehrt das Gerät in die Ausgangsposition zurück.

Die unter Verwendung dieser "Motorpipette" gemessenen Aggregationswerte entsprachen in Höhe und Präzision denen eines erfahrenen Untersuchers. Das Gerät ist seitdem Bestandteil der Standardmethode.

2.1.10. Ausschlußkriterien für die AW-Bestimmung

In früheren Untersuchungen durch BOSS et al. [8,11] zeigte sich, daß der AW bei verschiedenen Erkrankungen und Zuständen, die mit einer Akute-Phase-Reaktion einhergehen, erhöht ist. Dies gilt für akute Entzündungen und Zustände nach Operationen, schweren Traumen, Herzinfarkt oder Embolie. Oft ist der AW noch Monate nach dem akuten Ereignis erhöht. WIETELMANN fand, daß Schwangere in der Regel ebenfalls einen erhöhten AW haben [102]. Andererseits wurde bei Einnahme bestimmter Medikamente wie Kortikoide, Azetylsalizylsäure oder Lipidsenker eine Absenkung des AW beobachtet [8,9,11]. In allen diesen Fällen ist eine Beurteilung des AW im Hinblick auf die kardiovaskuläre Situation nicht möglich. Probanden, bei denen eines der genannten Kriterien vorliegt, müssen deshalb von der Auswertung ausgeschlossen werden. Diese Prämisse der AW-Untersuchung wurde auch in der vorliegenden Arbeit zugrundegelegt (vgl. Abschnitt 2.2.4.4.1.).

2.2. AW-Messungen im Rahmen des MONICA-Projektes Augsburg

2.2.1. Das internationale MONICA-Projekt

25-50 % aller Todesfälle in den Industrieländern sind durch kardiovaskuläre Krankheiten bedingt. Die in den nationalen Gesundheitsstatistiken ermittelten Sterbeziffern für die kardiovaskulären Haupttodesursachen Herzinfarkt und Schlaganfall zeigen sehr starke Unterschiede von Land zu Land und sehr verschiedene zeitliche Trends an.

So fiel die kardiovaskuläre Mortalitätsrate in den 70er Jahren in manchen Ländern, und zwar sowohl von hohem (z.B. Finnland) wie auch von mittlerem (z.B. USA) und niedrigem (z.B. Norwegen) Ausgangsniveau, während sie in anderen Ländern auf hohem Niveau stagnierte (z.B. Irland) oder von hohem (z.B. Ungarn) bis mittlerem (z.B. Jugoslawien) Niveau anstieg [97].

Eine Erklärung dieser offensichtlichen Unterschiede wäre von außerordentlicher Bedeutung für das Verständnis der kardiovaskulären Erkrankungen und ihre Prävention, stößt jedoch auf beträchtliche Schwierigkeiten. Erstens sind Validität und Vergleichbarkeit krankheitsspezifischer Sterbeziffern in den auf Todesbescheinigungen basierenden offiziellen Mortalitätsstatistiken von unterschiedlichen Gepflogenheiten bei der Ausstellung dieser Dokumente in den verschiedenen Ländern beeinträchtigt. Zweitens können unterschiedliche Mortalitätsraten durch Unterschiede in der Morbidität (Inzidenzrate) oder der Letalität (case fatality) oder in beiden Kenngrößen bedingt sein. Morbiditätsunterschiede können Fol-

ge von unterschiedlichen Häufigkeiten bekannter oder unbekannter Risikofaktoren sein. Auf die Letalität haben sowohl der natürliche Verlauf der Krankheit als auch die medizinische Versorgung Einfluß. Denkbar ist auch eine Konstanz der Mortalität trotz ausgeprägter, sich aber gegenseitig aufhebender Veränderungen der Einflußgrößen (z.B. Anstieg der Inzidenz infolge zunehmender Risikofaktoren bei gleichzeitig abnehmender Letalität infolge verbesserter medizinischer Versorgung).

In fast allen Ländern sind die Daten über die kardiovaskuläre Morbidität (Inzidenzrate) und Letalität und das Risikofaktorenprofil unzureichend [97]. Nicht zuletzt ist die Vergleichbarkeit der verfügbaren Daten angesichts methodischer Unterschiede zweifelhaft.

Die unzureichende Datenlage läßt eine "Erklärung" der unterschiedlichen Niveaus und Trends der kardiovaskulären Mortalität in den verschiedenen Ländern zur Zeit nicht zu [97,106]. Aufgrund dieser unbefriedigenden Situation wurde zu Beginn der 80er Jahre von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) das internationale MONICA-Projekt entwickelt (MONICA = Multinational Monitoring of Trends and Determinants in Cardiovascular Disease), mit dessen Hilfe verläßliche Daten gewonnen werden sollen für die Untersuchung der Ursachen und der Entstehungsweise kardiovaskulärer Krankheiten anhand von zeitlichen Verläufen und Vergleichen verschiedener Populationen. Langfristiges Ziel ist eine Verbesserung der primären und sekundären Prävention der Herz-Kreislauf-Erkrankungen und ihrer Therapie.

Am internationalen MONICA-Projekt nehmen derzeit 41 Zentren in 27 Ländern in Europa, Asien, Australien, Neuseeland und Nord-Amerika teil. In genau definierten Populationen werden über einen Zeitraum von 10 Jahren mit standardisierten Methoden die Inzidenz-, Letalitäts- und Mortalitätsraten für Herzinfarkt und Schlaganfall und das kardiovaskuläre Risikofaktorenprofil sowie Daten zur medizinischen Versorgung erhoben [106].

Zur Ermittlung der Inzidenz-, Letalitäts- und Mortalitätsraten werden alle in der Studienpopulation eines Zentrums auftretenden Fälle in einem Herzinfarkt- und Schlaganfall-Register erfaßt und dokumentiert. Zur Abschätzung des kardiovaskulären Risikofaktorenprofils in der Bevölkerung werden drei Querschnittsstudien (am Anfang, in der Mitte und am Ende der 10-Jahres-Periode) an voneinander unabhängigen Zufallsstichproben aus der Population durchgeführt. Zur Gewährleistung der methodischen Standards wurden Qualitätskontrollzentren (z.B. für Lipidbestimmungen, EKG-Auswertung und Herzinfarktdiagnostik) eingerichtet. Zur Auswertung werden die Daten aller MONICA-Zentren in einem Datenzentrum zusammengeführt und gemeinsam analysiert (zusätzlich zur lokalen Auswertung in den einzelnen Zentren).

2.2.2. Das MONICA-Projekt Augsburg

Ein Beitrag der Bundesrepublik Deutschland zum internationalen MONICA-Projekt ist die "Herz-Kreislauf-Studie in der Region Augsburg" (im folgenden kurz als MONICA-Projekt Augsburg bezeichnet). Organisation und wissenschaftliche Leitung

liegen bei der Arbeitsgruppe Epidemiologie des Instituts für Medizinische Informatik und Systemforschung (MEDIS-Institut) der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung (GSF) in Neuherberg bei München (Leiter der Arbeitsgruppe: Dr. Ulrich Keil, Ph.D.; Leiter des Instituts: Prof. W. van Eimeren) [48,49,50].

Das Studiengebiet umfaßt die Stadt Augsburg sowie die angrenzenden Landkreise Augsburg und Aichach-Friedberg mit insgesamt etwa 530000 Einwohnern. Die Datenerhebungsphase dauert von 1984 bis 1995. In Zusammenarbeit mit den Krankenhäusern, niedergelassenen Ärzten und Gesundheitsämtern im Studiengebiet und den benachbarten Landkreisen werden während dieser Zeit in einem Herzinfarkt-Register alle Herzinfarktfälle in der Studienpopulation (25-74 Jahre) erfaßt und dokumentiert. Es werden Daten zu Anamnese, klinischem Verlauf, Diagnostik und Therapie erhoben. Eine Nachuntersuchung (follow-up) der Überlebenden findet ebenfalls statt [49].

Für die drei Querschnittsstudien zur Abschätzung der Prävalenz von bekannten und möglichen Risikofaktoren, die 1984/85, 1989/90 und 1994/94 durchgeführt wurden bzw. geplant sind, werden jeweils voneinander unabhängige altersgeschichtete Zufallsstichproben der Altersgruppe zwischen 25 und 64 Jahren (ohne Ausländer) aus dem Einwohnermeldeverzeichnis gezogen [48].

Zusätzlich zum MONICA-Kernprogramm sollen in einer Kohortenstudie nach dem Vorbild der klassischen Bevölkerungsstudien, wie z.B. der Framingham-Studie, die Teilnehmer der ersten Querschnittsstudie nach 3 Jahren (1987/88), nach 6 Jahren

(1990/91) und nach 9 Jahren (1993/94) erneut untersucht und in Verbindung mit dem Herzinfarktregister die Herzinfarkt-Morbidität und -Mortalität dieser Gruppe erfaßt werden [48,49].

Abbildung 10 gibt einen Überblick über den Zeitplan des MONICA-Projektes Augsburg.

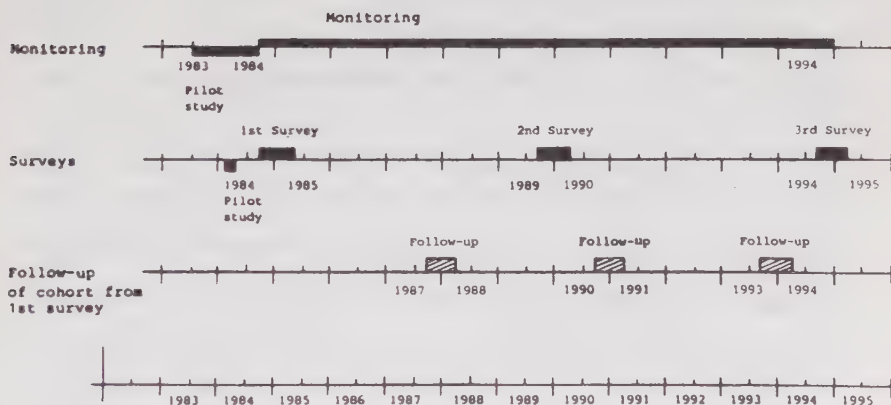


Abb. 10: Zeitplan des MONICA-Projektes Augsburg.
(aus [48,49]).

2.2.3. Die 1. Querschnittsstudie des MONICA-Projektes Augsburg

Nachdem das Herzinfarktregister am 1. Oktober 1984 seine Arbeit aufgenommen hatte, fand von Oktober 1984 bis Mai 1985 die 1. Querschnittsstudie statt.

2.2.3.1. Stichprobe

Im Hinblick auf die statistische Absicherung der erwarteten schwachen Veränderungen der untersuchten Variablen wurde eine Teilnehmerzahl von mindestens 400 in jeder der 8 Untergruppen nach Alter und Geschlecht angestrebt (je vier 10-Jahres-Altersklassen - 25-34, 35-44, 45-54 und 55-64 Jahre - für Frauen und Männer). Unter der Annahme einer - vorsichtig geschätzten - Beteiligungsrate von 60 % wurden 664 Probanden je Untergruppe, d.h. eine Gesamtstichprobe von 5312 Personen, aus der 25-64jährigen Bevölkerung mit deutscher Staatsangehörigkeit und Hauptwohnsitz im Studiengebiet gezogen [48]. Dabei wurde in der Stadt Augsburg nur nach dem Alter geschichtet; in den Landkreisen wurde ein zweistufiges Cluster-Verfahren angewandt [48].

Von der im Juli 1984 gezogenen (Brutto-)Stichprobe von 5312 Personen waren zum Zeitpunkt der Untersuchung 5069 Personen bzw. 95,4 % erreichbar (Netto-Stichprobe). Der Rest war inzwischen verstorben, aus dem Studiengebiet weggezogen oder aus sonstigen Gründen (falsche Adresse, Inhaftierung, usw.) unerreichbar. Von den erreichbaren Probanden nahmen insgesamt 4022 an der Studie teil. Dies entspricht einer Beteili-

gungsrate von 75,7 % der Brutto-Stichprobe bzw. 79,3 % der Netto-Stichprobe. Der Rest war trotz intensiver Anstrengungen seitens der Mitarbeiter der mit der Durchführung des Feldes beauftragten Institution (Fa. Sozialdata, München) - mehrfach schriftliche und telefonische Kontaktaufnahme, Ankündigungen in Presse und Rundfunk, durchgehende, bis zu 12-stündige Öffnungszeiten der Untersuchungszentren, Abend- und Samstagstermine, Terminvereinbarung zur Vermeidung von Wartezeiten, Angebot von Fahrdienst und Hausbesuchen - nicht zur Teilnahme zu bewegen.

2.2.3.2. Organisation

Für die 1. Querschnittsstudie wurden insgesamt 16 Untersuchungszentren - in Gesundheitsämtern, Schulen und sonstigen kommunalen Gebäuden sowie in Räumen des Roten Kreuzes - eingerichtet. Ein Hauptzentrum in zentraler Lage von Augsburg war während des gesamten Studienzeitraumes geöffnet, wohingegen die restlichen Zentren, auf die Randbezirke Augsburgs und Landkreisgemeinden verteilt, jeweils nur für einige Wochen bestanden. Bis zu drei Zentren waren gleichzeitig in Betrieb. Die Wahl des Untersuchungszentrums stand den Teilnehmern frei.

Die Untersuchungen wurden von medizinisch ausgebildeten Untersucherinnen (größtenteils Krankenschwestern) durchgeführt, die in Vorbereitungskursen für die speziellen Anforderungen der Studie fortgebildet wurden (u.a. intensives Training in der standardisierten Technik der Blutdruckmessung).

2.2.3.3. Untersuchungsprogramm

Das Untersuchungsprogramm der 1. Querschnittsstudie umfaßte ein ausführliches standardisiertes Interview, die Messung von Blutdruck, Körpergewicht und Körpergröße, die Ableitung eines Elektrokardiogramms, eine Blutentnahme für die Bestimmung biochemischer Parameter sowie einen Selbstausfüllfragebogen. Die Untersuchung dauerte in der Regel etwa eine Stunde.

Im Interview wurde mit exakt vorgegebenen Formulierungen nach folgenden Punkten gefragt: Sozioökonomische Faktoren wie Ausbildung, familiäre und berufliche Situation; allgemeine Krankheitsanamnese, spezielle Herz-Kreislauf-Anamnese (Angina pectoris-Symptome, bereits bekannte Diagnosen wie z.B. Hypertonie, spezifische Familienanamnese), Inanspruchnahme medizinischer Versorgung, exakte Medikamentenanamnese der letzten 7 Tage; Rauchgewohnheiten, Alkoholkonsum, Ernährung, körperliche Aktivität in Beruf und Freizeit.

Die Laboruntersuchungen wurden im klinisch-chemischen Labor des Zentralklinikums Augsburg durchgeführt. Zur Blutentnahme wurde am sitzenden Probanden nach möglichst kurzer Stauung mit einer 20G/0,9mm-Kanüle eine Kubitalvene punktiert und 25 ml Blut in eine Sicherheits-Monovette^R (Fa. Sarstedt, Nümbrecht) ohne Antikoagulans aufgezogen. Von dem Blut wurde eine kleine Menge sofort in ein EDTA-Röhrchen abgespritzt und gut gemischt. Diese Probe war für eine externe Zusatzuntersuchung bestimmt (Messung von Plasmaviskosität, Hämoglobinkonzentration im Vollblut und Proteinkonzentration im Serum; Dr. E. Ernst und Dr. A. Matrai, Hämorheologisches Labor

der Klinik für Physikalische Medizin der Universität München). Die Blutproben wurden im Kühlschrank aufbewahrt. In zweistündigem Abstand wurden die Proben zentrifugiert und das Serum abgenommen und wieder im Kühlschrank aufbewahrt. Jeden Abend wurden die Proben vom Fahrdienst in den Zentren abgeholt und in Kühlcontainern ins Labor im Zentralklinikum gebracht. Die Untersuchungen wurden am nächsten Tag im Rahmen des Routineprogramms durchgeführt. Die Qualitätskontrolle wurde nach den geltenden Richtlinien durchgeführt.

Es wurden folgende Parameter bestimmt:

- Gesamt-Cholesterin im Serum (Cholesterinoxidase-Phenol-4-Aminophenazon-Methode = CHOD-PAP-Methode)
- HDL-Cholesterin im Serum (Fällung der Apolipoprotein B-haltigen Lipoproteine LDL, VLDL, Lp(a) mit Phosphorwolframsäure/Magnesiumchlorid und anschließende Cholesterinbestimmung mit der CHOD-PAP-Methode)
- Harnsäure im Serum (Peroxidase-Methode)
- Kreatinin im Serum (Methode nach JAFFE)
- Gamma-Glutamyl-Transferase-Aktivität (γ -GT) im Serum (Endpunktmethode)
- Thiocyanat (Methode nach BUTTS)

Für die Blutdruckmessungen wurde ein Random-Zero-Quecksilber-Manometer (Fa. Hawksley & Sons, Großbritannien) verwendet, wobei drei verschiedene Manschetten (12x23, 12x28 und

14x40 cm) zur Verfügung standen. Nach einer fünfminütigen Ruhephase wurden drei Messungen im Abstand von jeweils drei Minuten am rechten Arm des sitzenden Probanden durchgeführt. Die Angaben in der vorliegenden Arbeit beziehen sich auf den Mittelwert aus der zweiten und dritten Messung.

Als Maß für das Übergewicht wurde der Body-Mass-Index (BMI) nach QUETELET berechnet:

$$\text{Body-Mass-Index (BMI)} = \frac{\text{Körpergewicht [kg]}}{(\text{Körpergröße [m]})^2}$$

2.2.3.4. Datenschutz

Eine mißbräuchliche Verwendung von personenbezogenen Daten wurde bereits durch die Anlage der Querschnittsstudie weitgehend ausgeschlossen. Jedem Mitglied der Stichprobe wurde eine Probandennummer zugeordnet. Bei der Untersuchung der Probanden wurden sämtliche Daten sofort anonymisiert, indem Fragebögen, Untersuchungsprotokolle und Blutproben ausschließlich mit der Probandennummer gekennzeichnet wurden. Den mit der Untersuchung von Proben und/oder der Auswertung der Daten befaßten Personen und Institutionen (MEDIS-Institut und "Gastforscher") liegen ausschließlich die anonymisierten Daten und die Probandennummer vor, während die mit der praktischen Durchführung der Studie beauftragte Institution (Fa. Sozialdata, München) als einzige über die identifizierenden Daten wie Name und Anschrift verfügt, andererseits aber keinen Zugang zu den Befunden hat. Alle an der

Erhebung und Auswertung der Daten beteiligten Personen unterliegen der Schweigepflicht.

Auch die Teilnehmer der vorliegenden Zusatzstudie wurden während der Datenerhebung und -auswertung ausschließlich über ihre Probandennummer identifiziert.

2.2.4. Die AW-Bestimmung im Rahmen der 1. Querschnitts-Studie des MONICA-Projektes Augsburg

2.2.4.1. Organisation

Aus technischen und personellen Gründen konnten AW-Messungen nur in der Zeit von Anfang März bis Ende Mai 1985 durchgeführt werden. Auch in diesem Zeitraum konnten jedoch nicht alle MONICA-Teilnehmer untersucht werden. Die Kapazität der Meßapparatur von maximal vier Proben je Stunde hätte nicht ausgereicht, um die in Spitzenzeiten bei drei gleichzeitig geöffneten Untersuchungszentren anfallenden Probenzahlen (bis zu 60 pro Tag) zu verarbeiten. Außerdem wäre, da die AW-Messung innerhalb von vier Stunden nach der Blutentnahme erfolgen soll (vgl. Abschnitt 2.1.5.5.), ein sehr aufwendiger Transport der Blutproben erforderlich gewesen, um Probanden aus mehreren Zentren einbeziehen zu können.

Aus den genannten Gründen wurde der AW-Meßplatz direkt in einem Untersuchungszentrum stationiert und nur Blut von Probanden dieses Zentrums untersucht. Der Meßplatz befand sich zunächst im Hauptzentrum in Augsburg und wurde dann nacheinander in die Zentren in Friedberg (Landkreis Aichach-Friedberg) und Gersthofen (Landkreis Augsburg) verlegt.

2.2.4.2. Probanden

Bei 307 Teilnehmern der 1. Querschnittsstudie des MONICA-Projektes Augsburg wurde zusätzlich zum MONICA-Untersuchungsprogramm (vgl. Abschnitt 2.2.3.3.) der AW bestimmt.

2.2.4.3. Blutentnahme und Aufarbeitung der Proben

Die für die AW-Messung erforderliche EDTA-Blutprobe wurde in der Regel bei der Blutentnahme im Rahmen der MONICA-Untersuchung zusätzlich abgenommen. Das im MONICA-Projekt Augsburg verwendete Blutabnahmesystem (Sicherheits-Monovetten^R, Fa. Sarstedt, Nümbrecht) ermöglicht mit Hilfe einer Doppelkanüle mit Ventilmechanismus und Führungshülse (Monovetten-Kanüle^R) in Verbindung mit dem Membran-Verschluß der Sicherheits-Monovette ein problemloses Auswechseln der Probenröhrchen und damit die Abnahme mehrerer Proben ohne wesentliche Mehrbelastung von Proband und Untersucher bei minimalem Infektionsrisiko (geschlossenes System). Nach Punktion einer Kubitalvene wurde zunächst eine 25 ml-Monovette (Artikel-Nr. 01.1080; 25/97 mm) für die MONICA-Laboruntersuchungen und anschließend eine mit K₂-EDTA beschichtete 5 ml-Monovette (Artikel-Nr. 04.1069; 16,5/57 mm) für die AW-Bestimmung gefüllt. Je nach Venenverhältnissen wurde mit einer 20G/0,9 mm- (Artikel-Nr. 85.1160) oder einer 21G/0,8 mm-Monovetten-Kanüle (Artikel-Nr. 85.1162) punktiert. Der EDTA-Monovette waren vorher 140 µg (=1000 KIE) Aprotinin (=50 µl Trasylol^R, Fa. Bayer, Leverkusen; Aprotiningehalt: 2,8 mg/ml bzw. 20000 KIE/ml) zugegeben worden. Bei 5 ml Füllvolumen

beträgt die EDTA-Konzentration 1,5-2,0 mg/ml ($\approx 3,7-4,9$ mmol/l) und die Aprotinin-Konzentration 28 µg/ml bzw. 200 KIE/ml.

In einigen Fällen mit größeren Schwierigkeiten bei der Blutabnahme war keine AW-Messung möglich.

Eine Reihe von Probanden suchten das Hauptzentrum in Augsburg nur zur Teilnahme an einer Zusatzstudie auf (sonografische Untersuchung der Karotiden), nachdem sie bereits zu einem früheren Zeitpunkt und/oder in einem anderen Untersuchungszentrum an der MONICA-Untersuchung teilgenommen hatten. Bei 14 dieser Probanden konnte nach einer gesonderten Blutabnahme ebenfalls der AW bestimmt werden.

Das EDTA-Blut wurde in der beschriebenen Weise verarbeitet (Gewinnung von Vollblut- und Plasma-Probe und anschließende AW-Messung; vgl. Abschnitt 2.1.5.). Die einzige Abweichung bestand in der Verwendung einer - leichter transportablen - Tischzentrifuge (Mikroliter, Fa. Hettich, Tuttlingen; Artikel-Nr. 2020 mit Winkelrotor Universal 1200, Artikel-Nr. 1373) anstelle der sonst benützten Laborzentrifuge. Das EDTA-Blut wurde nach Abnahme der Vollblutprobe (0,5 ml) auf Reagiergefäße mit je 1,5 ml Fassungsvermögen verteilt und das Plasma nach der Zentrifugation (10 Minuten, 9600 min^{-1} , ca. $4600 \times g$ in Gefäßmitte) wieder vereinigt. Anschließend wurde der AW gemessen. Der Zeitabstand zwischen Blutentnahme und AW-Messung betrug maximal vier Stunden.

2.2.4.4. Auswertung

2.2.4.4.1. Ausgewertete Probanden

Von den insgesamt untersuchten 307 Probanden wurden 54 von der Auswertung ausgeschlossen, da bei ihnen einer oder mehrere der bekannten Störfaktoren der AW-Bestimmung vorlagen (vgl. Abschnitt 2.1.10.) oder der zeitliche Abstand zwischen der MONICA-Untersuchung und -Blutabnahme und der AW-Bestimmung größer als 14 Tage war.

Bei 27 Probanden führten Angaben in der Anamnese zum Ausschluß (bestehende oder kurz zurückliegende akute Erkrankung; chirurgischer Eingriff, größeres Trauma oder Herzinfarkt innerhalb der letzten 6 Monate; bestehende Schwangerschaft). Bei weiteren 18 Probanden fanden sich in der Medikamentenanamnese der vorhergehenden 7 Tage Substanzen, die den AW beeinflussen können (Kortikoide, Thrombozytenaggregationshemmer, Lipidsenker, Antiphlogistika). Auf einen Probanden trafen beide Kriterien zu.

Bei 8 Probanden lagen mehr als 14 Tage zwischen der MONICA-Untersuchung und der AW-Bestimmung.

Zur Auswertung gelangten 253 Probanden - 136 Männer und 117 Frauen - im Alter zwischen 25 und 64 Jahren. Die Verteilung auf die verschiedenen Alters- und Geschlechtsgruppen zeigt Tabelle 1.

Tabelle 1: Alters- und Geschlechtsverteilung der Probanden

Altersgruppe Jahre	Männer		Frauen		Summe	
	n	%	n	%	n	%
25-34	27	19,9	21	17,9	48	19,0
35-44	33	24,3	29	24,8	62	24,5
45-54	37	27,2	36	30,8	73	28,9
55-64	39	28,7	31	26,5	70	27,7
Summe	136	100,0	117	100,0	253	100,0

2.2.4.4.2. Risikofaktordefinitionen

In der vorliegenden Arbeit werden folgende Definitionen für die kardiovaskulären Hauptrisikofaktoren Hypertonie, Hypercholesterinämie und Zigarettenrauchen zugrundegelegt:

Hypertonie

Als Hypertoniker wurden alle Probanden eingestuft, bei denen hypertone Blutdruckwerte nach den Kriterien der WHO gemessen wurden (systolischer Blutdruck ≥ 160 mm Hg und/oder diastolischer Blutdruck ≥ 95 mm Hg). Zu dieser Gruppe gehören sowohl Personen, bei denen erstmals ein erhöhter Blutdruck festgestellt wurde, als auch solche mit bekannter, aber nicht oder nicht ausreichend behandelter Hypertonie. Kon-

trollierte Hypertoniker, d.h. Probanden mit bekannter Hypertonie und nicht-hypertonen Blutdruckwerten, wurden ebenfalls als Hypertoniker eingestuft.

Hypercholesterinämie

Für den Risikofaktor Hypercholesterinämie wurde der Grenzwert bei 260 mg/100 ml ($=6,72$ mmol/l) festgesetzt.

Rauchen

Als Raucher wurden alle Probanden eingestuft, die angaben, gelegentlich oder regelmäßig Zigaretten zu rauchen.

2.2.4.4.3. Statistische Methoden

Zur Untersuchung der Beziehungen zwischen dem AW und den kardiovaskulären Risikofaktoren wurden zwei verschiedene Vorgehensweisen gewählt. Zum einen wurde in einem Stratifizierungsmodell versucht, anhand von in sich möglichst homogenen Untergruppen, die untereinander möglichst definierte Unterschiede aufweisen, durch Vergleich der Mittelwerte bzw. Verteilungen des AW Assoziationen mit der Prävalenz einzelner bzw. kumulierter Risikofaktoren aufzudecken (Beispiel: Raucher ohne weitere Risikofaktoren im Vergleich zu Probanden ohne Risikofaktoren).

In einem zweiten Ansatz wurde in einer einfachen und multiplen linearen Regressions- und Korrelationsanalyse nach unabhängigen statistischen Determinanten des AW gesucht und der Frage nachgegangen, inwieweit die Variabilität des AW durch

die Variabilität bekannter und möglicher Risikofaktoren bzw. -indikatoren erklärt werden kann.

Da über die Verteilung des AW in der Bevölkerung bisher keine gesicherten Erkenntnisse vorliegen und die untersuchte Stichprobe eine deutlich rechtsschiefe Verteilung des AW aufwies, wurden soweit wie möglich nicht-parametrische Testverfahren eingesetzt (U-Test von WILCOXON, MANN und WHITNEY für Mittelwertsvergleiche zweier Gruppen, KRUSKALL-WALLIS-Test für Vergleiche mehrerer Gruppen) [77]. Bei Verfahren, die eine Normalverteilung voraussetzen (z.B. die Berechnung des PEARSONschen Produktmoment-Korrelationskoeffizienten), wurden die Aggregationswerte sowie die Werte anderer rechtsschief verteilter Variablen (z.B. Blutdruck, Cholesterin, Body Mass Index) nach logarithmischer Transformation ($\log x$) eingesetzt [77].

Das Signifikanzniveau wurde bei allen Tests auf $\alpha=0,05$ festgesetzt. Es wurde stets eine zweiseitige Fragestellung zugrundegelegt [77].

Die Auswertung wurde vom Verfasser auf einer IBM-Rechenanlage des MEDIS-Instituts mit Hilfe von Software-Systemen zur statistischen Analyse (SAS, BMDP) durchgeführt.

2.3. In vitro Versuche zum Mechanismus der Erythrozyten- aggregation

2.3.1. AW und Phosphorylierungsgrad des Fibrinogens

Proben von Fibrinogen mit hohem (49,5 % , High-P-Fibrinogen) und niedrigem (3 % , Low-P-Fibrinogen) Phosphorylierungsgrad am Fibrinopeptid A wurden freundlicherweise von Herrn Dr. H.H. Seydewitz und Frau Prof. I. Witt (Biochemisches Labor der Kinderklinik der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg) zur Verfügung gestellt. Der Terminus "Phosphorylierungsgrad" bezieht sich nicht auf das einzelne Fibrinogenmolekül - dieses kann phosphoryliert oder nicht phosphoryliert sein - , sondern auf die Gesamtheit des Fibrinogens in einer Probe; er gibt also den Anteil an phosphoryliertem Fibrinogen in der Probe an.

Der Fibrinogengehalt der lyophilisierten Präparationen betrug 8,7 % (HP-Fibrinogen) bzw. 8,3 % (LP-Fibrinogen), die restliche Masse bestand aus NaCl.

120 ml EDTA-Blut eines gesunden Spenders mit normalem AW wurden in üblicher Weise abgenommen und aufgearbeitet (vgl. Abschnitt 2.1.5.).

Für die Berechnung der Menge an HP- bzw. LP-Fibrinogen, die dem Plasma zugegeben werden sollte, wurden folgende Voraussetzungen bzw. Annahmen gemacht:

- Für das Fibrinogen im Plasma des gesunden Spenders wurde, um vom ungünstigsten Fall auszugehen, eine Konzentration an der oberen Grenze des Normalbereiches von 2-4 g/l

[96,107] angenommen und ein Phosphorylierungsgrad am Fibrinopeptid A von 25 % (in Anlehnung an die von SEYDEWITZ und WITT [89] gefundenen Werte bei gesunden Blutspendern ($23,6 \pm 3,6$ %) und in kommerziellen Fibrinogenpräparaten (22,0-24,5 %)).

- Um den zu untersuchenden Effekt des Phosphorylierungsgrades des Fibrinogens auf den AW möglichst deutlich hervortreten zu lassen, sollte der Unterschied im Phosphorylierungsgrad nach Zugabe von HP- bzw. LP-Fibrinogen zum Normalplasma möglichst groß sein.
- Da nach Zugabe von HP- bzw. LP-Fibrinogen zum Plasma in jedem Fall eine AW-Erhöhung aufgrund der vermehrten Fibrinogengesamtkonzentration zu erwarten war, mußte die Zugabemenge für beide Proben (Plasma + HP-Fibrinogen und Plasma + LP-Fibrinogen) gleich sein.
- Die Gesamtkonzentration an Fibrinogen nach Zugabe von HP- bzw. LP-Fibrinogen zum Plasma sollte nicht zu hoch sein, um einen Anstieg des AW auf extrem hohe Werte (mit meßtechnischen Problemen) zu vermeiden.
- Die Zugabe von HP- bzw. LP-Fibrinogen sollte möglichst wenig unerwünschte Wirkungen auf das Plasma zur Folge haben. Insbesondere sollten bekannte Störfaktoren der AW-Bestimmung wie große Zeitabstände zwischen Blutabnahme und Messung, Plasmaverdünnungen durch Zugabelösungen und Änderungen der Plasmaosmolalität klein gehalten werden. Im Idealfall sollten nur die Fibrinogenkonzentration (Erhöhung um

den gleichen Betrag in beiden Proben) und der Phosphorylierungsgrad des Fibrinogens (Erhöhung nach Zugabe von HP-Fibrinogen, Absenkung nach Zugabe von LP-Fibrinogen) verändert werden.

Der Phosphorylierungsgrad einer Plasmaprobe errechnet sich aus der vorhandenen und zugesetzten Fibrinogenmenge (pro Volumeneinheit) und den entsprechenden Phosphorylierungsgraden nach folgender Formel :

$$P_x = \frac{Fib_O \cdot P_O + Fib_+ \cdot P_+}{Fib_O + Fib_+} \quad (1)$$

wobei

Fib_O = Fibrinogenkonzentration des Nativplasmas [g/l]

Fib_+ = Fibrinogenzugabe [g/l]

P_O = Phosphorylierungsgrad des Plasmafibrinogens [%]

P_+ = Phosphorylierungsgrad des zugegebenen Fibrinogens [%]

P_x = Phosphorylierungsgrad in der Probe [%]

Das Verhältnis der Phosphorylierungsgrade der durch Zugabe von HP- bzw. LP-Fibrinogen zu Plasma hergestellten Proben wird mit F bezeichnet:

$$F = \frac{P_H}{P_L} \quad (2)$$

wobei

P_H = Phosphorylierungsgrad von "Plasma + HP-Fibrinogen"

P_L = Phosphorylierungsgrad von "Plasma + LP-Fibrinogen"

Durch Einsetzen von (1) in (2) ergibt sich nach Kürzen des Ausdrucks $Fib_O + Fib_+$:

$$F = \frac{Fib_O \cdot P_O + Fib_+ \cdot P_{HP}}{Fib_O \cdot P_O + Fib_+ \cdot P_{LP}} \quad (3)$$

wobei

P_{HP} = Phosphorylierungsgrad des HP-Fibrinogens

P_{LP} = Phosphorylierungsgrad des LP-Fibrinogens

Durch Umformen erhält man :

$$Fib_+ = \frac{Fib_O \cdot P_O \cdot (F - 1)}{P_{HP} - F \cdot P_{LP}} \quad (4)$$

Für die Berechnung der Zugabemenge an HP- bzw. LP-Fibrinogen wurden folgende Werte in Formel (4) eingesetzt:

$Fib_O = 4,0 \text{ g/l}$ (geschätzt; obere Grenze des Normalbereiches)

$P_O = 25 \%$ (geschätzt nach Literaturangaben, siehe oben)

$P_{HP} = 50 \%$ (bekannt)

$P_{LP} = 3 \%$ (bekannt)

$F = 2$ (Zielvorgabe, um Mindestunterschied zwischen den beiden Proben zu gewährleisten)

Es ergibt sich eine Zugabemenge von 2,27 g/l, wobei

$P_H = 34 \%$ und $P_L = 17 \%$ werden.

Die Proben wurden folgendermaßen hergestellt: 65,0 mg der HP-Fibrinogen-Präparation und 68,7 mg der LP-Fibrinogen-Präparation (entspricht jeweils 5,67 mg Fibrinogen) wurden in je 2500 μ l des Plasmas gelöst, was einer rechnerischen Zunahme der Fibrinogenkonzentration um 2,27 g/l entspricht. Infolge des hohen Salzgehaltes der Fibrinogenpräparationen (>90 % der Masse = NaCl) kam es zu einem massiven Anstieg der Osmolalität in den Proben von 280 mosmol/kg (unbehandeltes Plasma) auf 1160 mosmol/kg (Plasma + HP-Fibrinogen) bzw. 1180 mosmol/kg (Plasma + LP-Fibrinogen). Eine Ausfällung von Plasmabestandteilen trat jedoch nicht auf; das zugegebene Material löste sich vollständig. Zur Entfernung des überschüssigen NaCl und Normalisierung der Osmolalität wurden von den so hergestellten Proben je 2 ml in dünne Dialyseschläuche gefüllt und gemeinsam in einem Reagenzglas gegen 8 ml des unbehandelten Plasmas dialysiert, wobei das Plasma 4 mal gegen frisches Plasma ausgetauscht wurde (insgesamt 5 Dialyseschritte gegen doppeltes Probenvolumen, Dauer jeweils 30 Minuten). Nach der Dialyse betrug die Osmolalität in den Proben 300 mosmol/kg (Plasma + HP-Fibrinogen) bzw. 302 mosmol/kg (Plasma + LP-Fibrinogen). Anschließend wurde der AW gemessen.

In einem zweiten Versuch, bei dem die Fibrinogenkonzentration im verwendeten Plasma bekannt war (3,56 g/l), wurde die Zugabemenge an HP- bzw. LP-Fibrinogen ebenfalls so gewählt, daß sich ein F von 2 ergab (Zugabe von je 2,0 g/l, damit Erhöhung der Fibrinogensamtkonzentration auf rechnerisch

5,56 g/l, Phosphorylierungsgrade: 34 % für Plasma + HP-Fibrinogen und 17 % für Plasma + LP-Fibrinogen). Ansonsten wurde der Versuch wie oben beschrieben durchgeführt: trockene Zugabe der Fibrinogenpräparationen, Entfernung des überschüssigen NaCl durch Dialyse gegen unbehandeltes Plasma (304 mosmol/kg), damit Senkung der Osmolalität von 950 mosmol/kg auf 322 mosmol/kg (Plasma + HP-Fibrinogen) bzw. von 965 mosmol/kg auf 324 mosmol/kg (Plasma + LP-Fibrinogen), anschließend AW-Messung.

2.3.2. AW nach Inkubation von Plasma bzw. Zugabe von Lysolecithin

Lysolecithin (L-a-Lysophosphatidylcholin, aus Eidotter) wurde von der Fa. Sigma, Deisenhofen bezogen (Produkt-Nr. L-4129). Von 2 Patienten mit kurz zurückliegendem Myokardinfarkt und bekannter AW-Erhöhung wurde in üblicher Weise EDTA-Blut entnommen und aufgearbeitet. Zunächst wurde als Basiswert der AW im unveränderten Plasma bestimmt. Anschließend wurden für jeden Patienten folgende Proben hergestellt: Kontrolle (2000 µl Plasma), Inkubationsprobe (2000 µl Plasma), Plasma + 1,0 mg Lysolecithin/ml (Lyso/1,0; 1500 µl) und Plasma + 0,1 mg Lysolecithin/ml (Lyso/0,1 ; 1500 µl). Für die Lysolecithin-Proben wurde eine Stammlösung mit einer Lysolecithin-Konzentration von 15 mg/ml in Plasma hergestellt (Lyso/15).

Da wegen der zu geringen Plasmamenge nicht für jede vorgesehene Inkubationsdauer eine eigene Probe mit 1500 µl zur Verfügung stand, wurde die Inkubation nach folgendem Schema

durchgeführt: Die Inkubationsprobe (2000 μ l Plasma) wurde 1 Stunde lang im unbewegten Wasserbad bei 37°C gehalten. Anschließend wurde die Probe aus dem Wasserbad genommen, 15 min zur Abkühlung bei Raumtemperatur stengelassen, dann 1500 μ l entnommen und der AW gemessen. Nach der Messung (Dauer ca. 20 min) wurden die zugegebenen Erythrozyten abzentrifugiert und das Plasma wieder mit dem währenddessen bei Raumtemperatur aufbewahrten Rest der Inkubationsprobe vereinigt und die Inkubation im Wasserbad fortgesetzt. Entsprechend wurde nach weiteren 2 Stunden Inkubation und daraufhin nach weiteren 3 Stunden Inkubation verfahren. Zuletzt wurde die Probe über Nacht für weitere 14 Stunden bei 37°C gehalten und anschließend der AW bestimmt. Es liegen somit Werte für (effektive) Inkubationszeiten von 1, 3, 6 und 20 Stunden vor. Die Kontrollprobe wurde bei Raumtemperatur stengelassen und nach 1 sowie nach 3 Stunden derselben Prozedur unterworfen wie die Inkubationsprobe (aus Zeitgründen ohne AW-Messung). Nach 6 Stunden bei Raumtemperatur wurde der AW der Kontrollprobe gemessen.

In den Proben mit Lysolecithin-Zugabe zum Plasma wurde der AW 15-30 min nach der Herstellung gemessen.

2.3.3. AW nach Neuraminidase-Behandlung von Plasma

Für die Behandlung von Plasma wurde Neuraminidase (Acylneuraminy-Hydrolase, E.C. 3.2.1.18) aus *Clostridium perfringens* verwendet, da diese keine divalenten Kationen benötigt, also auch in Gegenwart von EDTA aktiv ist. In Vorversuchen hatte sich Neuraminidase aus *Vibrio cholerae* (Fa. Behring-

werke, Marburg, Produkt-Nr. ORKD 04), die Calcium-Ionen benötigt, in Serum als aktiv erwiesen, nicht jedoch in EDTA-Plasma. Die Clostridium perfringens-Neuraminidase wurde sowohl in löslicher Form (Typ V, Fa. Sigma, Deisenhofen; Produkt-Nr. N-2876) als auch in einer Präparation mit durch Anlagerung an gekörnte Agarose immobilisiertem Enzym (Typ VI-A, Fa. Sigma, Deisenhofen, Produkt-Nr. N-5254) eingesetzt. Von der löslichen Form wurde durch Auflösen des Lyophilisats (10 U) in 2 ml H₂O bidest. eine Stammlösung mit 5 U/ml hergestellt. 1 U spaltet bei 37° und pH 5,0 pro Minute 1 µmol N-Acetylneuraminsäure (NANA) von dem Substrat NAN-Lactose ab (Herstellerangabe).

EDTA-Plasma wurde wie oben beschrieben gewonnen (vgl. Abschnitt 2.1.5.). In einer ersten Versuchsreihe wurden dem Plasma 10 Vol.-% der Neuraminidase-Stammlösung zugegeben, so daß die Aktivität in den Proben 0,5 U/ml betrug. Die Inkubationsbedingungen wurden nicht auf die Anforderungen des Enzyms optimiert, um Effekte von pH und Temperatur auf den AW zu vermeiden. In einer anderen Versuchsreihe hatte sich gezeigt, daß der AW bei Inkubation von nativem EDTA-Plasma (ohne Enzymzugabe) bei 37° C wesentlich stärker absinkt als unter Aufbewahrung bei Raumtemperatur (vgl. Abschnitt 2.3.1.). Es wurde deshalb bei Raumtemperatur und unverändertem Plasma-pH über drei Stunden inkubiert.

Diese ersten Versuche waren nicht für die eigentliche Fragestellung (Bedeutung der endständigen Neuraminsäuren der Plasma-Glykoproteine für den AW) verwertbar, da wegen der relativ hohen Neuraminidase-Aktivität in den Plasmaproben schon während der kurzen Zeit der AW-Messung eine deutliche

Enzymwirkung auf die Erythrozyten zu beobachten war, die eine Beurteilung des Effekts der Plasmabehandlung unmöglich machte: Der AW stieg mit zunehmender Expositionszeit der Zellen an und zeigte nicht die sonst stets feststellbare Abhängigkeit von der Rotationsgeschwindigkeit. Meist war schon die zweite Teilmessung wegen ständiger Verstopfungen der Meßöffnung nicht mehr durchführbar. Diese Steigerung der Aggregierbarkeit der Erythrozyten ist auf die Verminderung ihrer Oberflächenladung und damit der abstoßenden Kräfte zwischen den Zellen zurückzuführen [13,38,57]. Eine im Prinzip mögliche Inaktivierung des Enzyms durch Erhitzung kam wegen der möglichen Artefakte durch Veränderung von Plasmaproteinen nicht in Frage. Auch Versuche, die Neuraminidase in der Probe vor der AW-Messung durch Zugabe von freier N-Acetylneuraminsäure (NANA) im Sinne einer Produkthemmung zu inaktivieren, brachten nicht den gewünschten Erfolg. Zwar konnte mit sehr hohen Konzentrationen (10 mg/ml bzw. ca. 32 mmol/l) ein Hemmeffekt erzielt werden, der ausreichend erschien, um die Beeinträchtigung der Erythrozyten während der Messung zu verhindern, jedoch kam es dabei zu einem starken pH-Abfall (pK_s von NANA = 2,6) und infolge der pH-Korrektur mit 1 N NaOH zu einer Zunahme der Osmolalität.

Die daraufhin eingesetzte immobilisierte Neuraminidase ließ sich nach der Inkubation (0,5 U/ml, Raumtemperatur, 3 Stunden, pH 7,4) problemlos durch Abzentrifugieren (bei ca. 2300xg) aus der Probe entfernen. Damit die Agarose-Körnchen mit dem daran gebundenen Enzym während der Inkubationszeit nicht sedimentierten, wurden die Probenröhrchen in einer aus

einem Schlauchpumpenantrieb (Microperpex^R, Fa. LKB, Omma, Schweden) gebauten Vorrichtung mit einer Umdrehungsfrequenz von 8 min^{-1} um ihre Querachse rotiert. Nach Zentrifugation wurden vom Überstand $1500 \mu\text{l}$ abgenommen und der AW gemessen. Als direkte Kontrolle diente eine Probe, die mit inerter Agarose (ohne Neuraminidase) angesetzt wurde.

Der Erfolg der Neuraminidase-Behandlung wurde durch photometrische Bestimmung der freien Neuraminsäure im behandelten Plasma nachgewiesen. Dazu wurde die Thiobarbitursäure-Methode nach WARREN [100,101] und AMINOFF [2] in der von SEDMAK et al. [87] angegebenen Form eingesetzt: Zu $0,2 \text{ ml}$ der Probe wird $0,1 \text{ ml}$ einer $0,2$ -molaren Perjodatlösung ($43 \text{ mg NaJO}_4/\text{ml}$) gegeben, die $9,2 \text{ mol/l}$ Phosphorsäure enthält ($0,62 \text{ ml } 85\%(w/w) \text{ H}_3\text{PO}_4/\text{ml}$). Nach 20 min bei Raumtemperatur wird 1 ml einer $1,0$ -molaren Arsenitlösung ($0,1 \text{ g NaAsO}_3/\text{ml}$) mit $0,5 \text{ mol/l}$ Natriumsulfat ($71 \text{ mg NaSO}_4/\text{ml}$) und ca. $0,05 \text{ mol/l}$ Schwefelsäure ($3 \mu\text{l } 95\%(w/w) \text{ H}_2\text{SO}_4/\text{ml}$) hinzugefügt und gut gemischt. Nach Zugabe von $2,5 \text{ ml}$ einer Lösung mit 40 mmol/l 2-Thiobarbitursäure (6 mg/ml) und $0,5 \text{ mol/l}$ Natriumsulfat ($73,5 \text{ mg Na}_2\text{SO}_4/\text{ml}$) wird die Probe für 15 min ins kochende Wasserbad gestellt, wobei sich, falls die Probe freie NANA enthält, ein roter Farbstoff bildet. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur werden 4 ml n-Butanol mit 5% (v/v) konzentrierter Salzsäure (32% (w/w)) zugegeben und der Farbstoff in die organische Phase ausgeschüttelt. Nach Trennung der Phasen durch 2-minütige Zentrifugation wird die Extinktion der Butanolphase bei 549 nm gemessen.

Für die Extinktionsmessungen wurde ein Zweistrahl-Spektralphotometer (Uvikon 810, Fa. Kontron, Eching) verwendet. Alle

Messungen wurden in Glasküvetten mit einer Probenschichtdicke von 1 cm durchgeführt. Die Meßwerte geben die Extinktionsdifferenz zwischen der jeweiligen Probe und der im zweiten Strahl gleichzeitig gemessenen Kontrollprobe (bzw. Leerwert) an.

Um das Ausmaß der NANA-Freisetzung durch die Neuraminidase-Behandlung von Plasma abschätzen zu können, wurde zum Vergleich der Gesamtgehalt an Neuraminsäure im Plasma durch saure Hydrolyse nach der Methode von SCHAUER [79,80] (0,2 ml Plasma + 0,8 ml 1 N HCl, pH ca. 1,0-1,5, 50 Minuten Inkubation bei 80°C) und anschließende NANA-Bestimmung (siehe oben) ermittelt.

Da auch die immobilisierte Neuraminidase große methodische Probleme bereitete (Aktivitätsverlust nach mehrfachem Waschen zur Entfernung von Plasmaresten, Verluste beim Pipettieren durch Adhäsion der Agarose-Partikel an Pipettenspitzen und Reagiergefäße), konnten nur sehr wenige verwertbare Versuche ausgeführt werden.

2.3.4. Versuche mit Thrombozyten

Folgende Substanzen wurden von der Fa. Sigma, Deisenhofen, BRD, bezogen:

Calcium Ionophor A23187, Produkt-Nr. C-7522

L-Lysin-Hydrochlorid, Produkt-Nr. L-5626

Galactosamin-Hydrochlorid, Produkt-Nr. G-0500

Glucosamin-Hydrochlorid, Produkt-Nr. G-4875

EDTA-Blut und Serum wurde in üblicher Weise (vgl. Abschnitt 2.1.5.) von gesunden Spendern gewonnen. Plättchenreiches

Plasma (platelet rich plasma, PRP) wurde durch 10minütige Zentrifugation bei 1500 U/min (=ca. 250xg) (Minifuge 2, Fa. Heraeus-Christ, Osterode am Harz) hergestellt. Plättchenarmes Plasma (platelet poor plasma, PPP) wurde aus PRP durch Zentrifugation bei 4500 U/min (=ca. 2300xg) für 10 min gewonnen.

Von dem Calcium-Ionophor A23187 wurde eine Stammlösung mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml (= 190 μ mol/l) in Tris/HCl-Puffer (pH 7,4) hergestellt. Zur Aktivierung der Thrombozyten wurde dem plättchenreichen Plasma A23187 in einer Endkonzentration von 1 μ g/ml (=1,9 μ mol/l) zugegeben (1980 μ l PRP + 20 μ l A23187-Stammlösung). Die Proben wurden gut gemischt, 2 min lang bei Raumtemperatur stehengelassen, anschließend 4 min bei ca. 5000xg zentrifugiert und das überstehende aktivierte plättchenarme Plasma (PPP_a) abgenommen.

In einem weiteren Versuch wurde EDTA-Blut einer Patientin mit instabiler Angina pectoris und erhöhtem AW verwendet. PRP und PPP wurden wie oben beschrieben hergestellt. Das bei der Herstellung von PPP aus PRP gewonnene Thrombozytensediment wurde 2 mal mit Tris/HCl-Puffer (pH 7,4) gewaschen (Puffervolumen = Ausgangsvolumen an PRP) und anschließend durch Zugabe von A23187 in einer Endkonzentration von 50 μ g/ml (=100 μ mol/l) aktiviert. Nach 2 min bei Raumtemperatur wurden die Thrombozyten abzentrifugiert und der "aktivierte" Überstand abgenommen.

Für Hemmversuche wurde den Proben in Anlehnung an GARTNER [26] eine basische Aminosäure (L-Lysin) oder ein Hexosamin (Glucosamin, Galactosamin) in Endkonzentrationen von 30

mmol/l zugesetzt.

Zur Freisetzung von Thrombozytenproteinen ohne chemische Stimulation wurde PRP bzw. gewaschene Thrombozyten eines gesunden Spenders 15 min lang im Ultraschallbad (Bransonic 12, Fa. Branson, Soest, Niederlande) behandelt. Eine identische Behandlung von Vollblut führte zu kompletter Hämolyse. Nach der Ultraschallbehandlung wurden die Proben 10 min bei 4500 U/min (ca. 2300xg) zentrifugiert und die Überstände gewonnen. Für das Thrombozytenkonzentrat wurde das gewaschene Sediment von 6 Volumenteilen PRP in 1 Volumenteil Tris/HCl-Puffer (pH 7,4) suspendiert.

3. ERGEBNISSE

3.1. AW-Bestimmungen im Rahmen des MONICA-Projektes Augsburg

3.1.1. Risikofaktorenprofil der untersuchten Stichprobe

In den Abbildungen 11 bis 15 sind die Mittelwerte von systolischem Blutdruck, Gesamtcholesterin im Serum, HDL-Cholesterin im Serum, HDL-Cholesterin/Gesamtcholesterin-Quotient und Body Mass Index in Abhängigkeit von Geschlecht und Altersgruppe dargestellt. Die Abbildungen 16 bis 18 veranschaulichen die Prävalenzraten der drei Hauptrisikofaktoren Hypertonie, Hypercholesterinämie und Rauchen.

Beide Darstellungsweisen lassen deutlich erkennen, daß die Mittelwerte des Blutdrucks und des Cholesterins (Abb. 11 und 12) sowie die Prävalenzraten der Hypertonie und der Hypercholesterinämie mit dem Alter zunehmen (Abb. 16 und 17). Dabei ist der Anstieg bei den Männern in den jüngeren Altersgruppen ausgeprägter und flacht im höheren Alter ab, während bei den Frauen erst nach dem 45. Lebensjahr eine Zunahme zu beobachten ist. In den drei jüngeren Altersgruppen liegen die Werte der Männer über denen der Frauen. In der ältesten Gruppe kehrt sich dieses Bild um.

Die Konzentration des High Density Lipoprotein (HDL)-Cholesterins im Serum zeigt keine wesentliche Änderung mit dem Alter und ist bei Frauen höher als bei Männern. Der Anteil des HDL-Cholesterins am Gesamtcholesterin ist in den jünge-

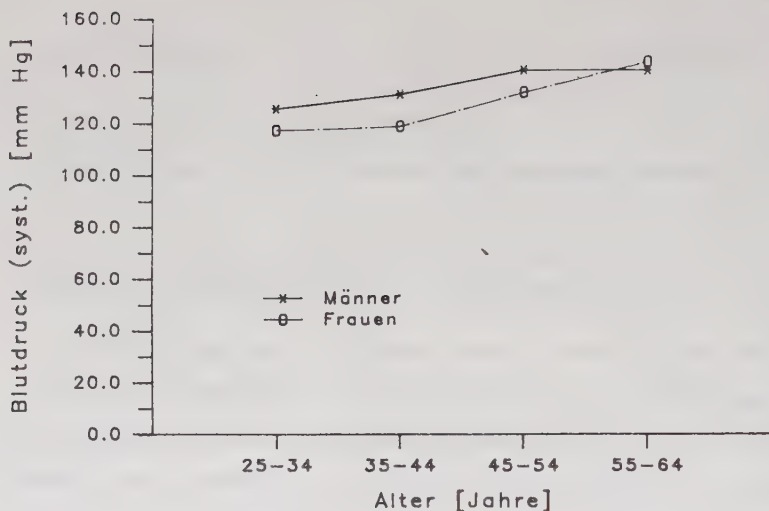


Abb. 11: Mittelwerte des systolischen Blutdrucks in der untersuchten Stichprobe nach Geschlecht und Alter (n=253).

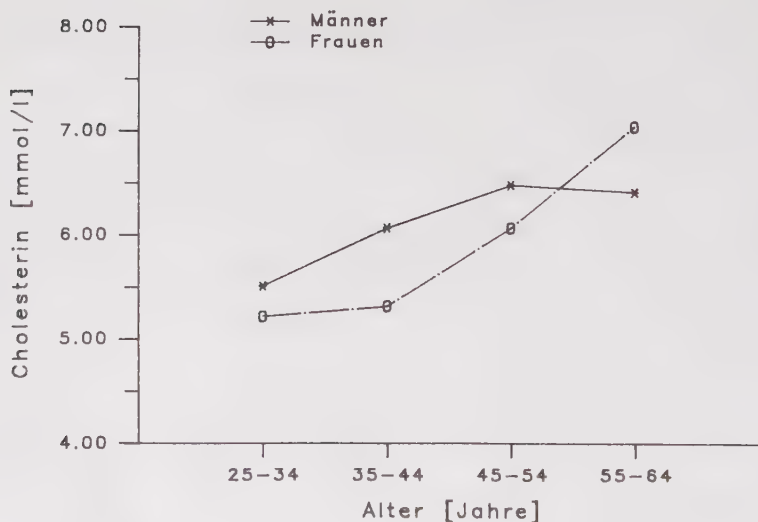


Abb. 12: Mittelwerte der Konzentration des Gesamt-Cholesterins im Serum in der untersuchten Stichprobe nach Geschlecht und Alter (n=252; 1 fehlender Cholesterinwert).

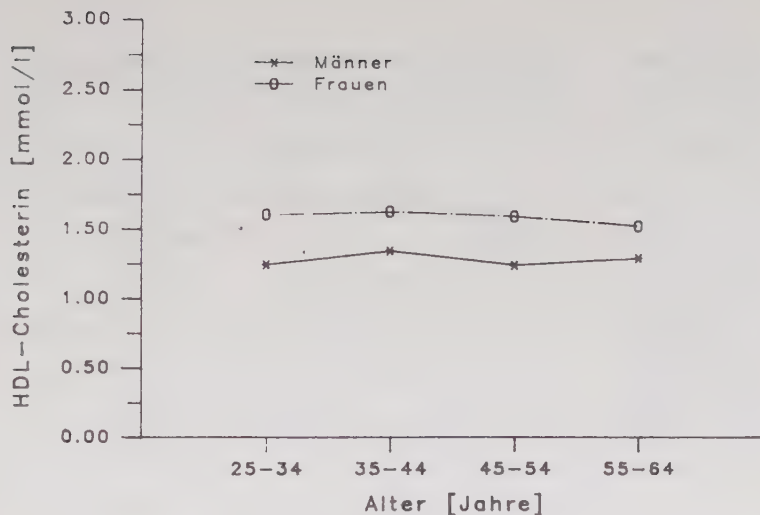


Abb. 13: Mittelwerte der Konzentration des HDL-Cholesterins im Serum in der untersuchten Stichprobe nach Geschlecht und Alter (n=253).

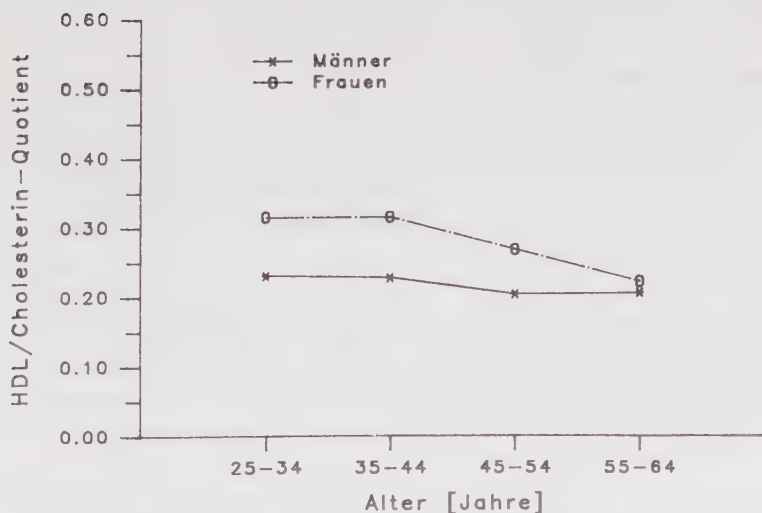


Abb. 14: Mittelwerte des Quotienten HDL-Cholesterin/Gesamt-Cholesterin in der untersuchten Stichprobe nach Geschlecht und Alter (n=252; 1 fehlender Cholesterinwert).

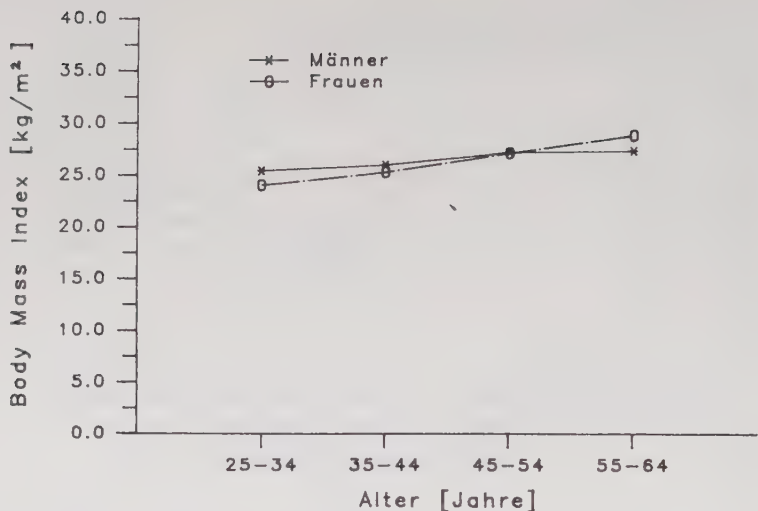


Abb. 15: Mittelwerte des Body Mass Index (Gewicht/Größe²) in der untersuchten Stichprobe nach Geschlecht und Alter (n=253).

ren Altersgruppen stabil und fällt in den älteren Klassen ab, bei den Männern leicht, bei den Frauen, die in allen Altersstufen einen höheren HDL-Anteil haben als die Männer, stärker (Abb. 14).

Der Mittelwert des Body Mass Index (BMI) nimmt bei den Männern und besonders bei den Frauen mit dem Alter deutlich zu (Abb. 15).

Die Prävalenz des Rauchens zeigt keinen einheitlichen Trend in Bezug auf die Altersgruppen. Mit Ausnahme der Altersgruppe 35-44 Jahre rauchen Männer häufiger als Frauen, besonders in den älteren Gruppen (Abb. 18).

Faßt man die Hauptrisikofaktoren Hypertonie, Hypercholesterinämie und Rauchen zusammen und unterteilt die Stichprobe in Probanden ohne Risikofaktoren und mit (1-3) Risikofaktoren, so ergibt sich das in Abbildung 19 dargestellte Bild. In Übereinstimmung mit den entsprechenden Altersverläufen der Hypertonie und der Hypercholesterinämie steigt die Häufigkeit der kumulierten Risikofaktoren bei den Männern mit dem Alter kontinuierlich an, während sie bei den Frauen erst in den höheren Altersgruppen zunächst leicht (45-54 Jahre) und dann sehr stark (55-64 Jahre) zunimmt. In den drei unteren Altersklassen ist die kumulierte Prävalenz bei den Männern höher als bei den Frauen, in der Gruppe der 55-64jährigen ist die Prävalenz bei Männern und Frauen gleichermaßen extrem hoch (nur ein knappes Fünftel der Probanden dieser Altersstufe weist keinen Risikofaktor auf). Eine Ausnahme bilden die 25-34jährigen Männer, die infolge ihres sehr hohen Anteils an Rauchern trotz geringer Häufigkeit von Hypertonie und Hypercholesterinämie in der Summe das Niveau der nächsthöheren Altersstufe erreichen.

Einen Überblick über die Prävalenz der Hauptrisikofaktoren und ihrer Kombinationen gibt Tabelle 2. Insgesamt sind fast zwei Drittel (64,7 %) der Männer und fast die Hälfte (48,7 %) der Frauen in der untersuchten Stichprobe durch einen oder mehrere Risikofaktoren belastet (Tabelle 2, Zeile 12).

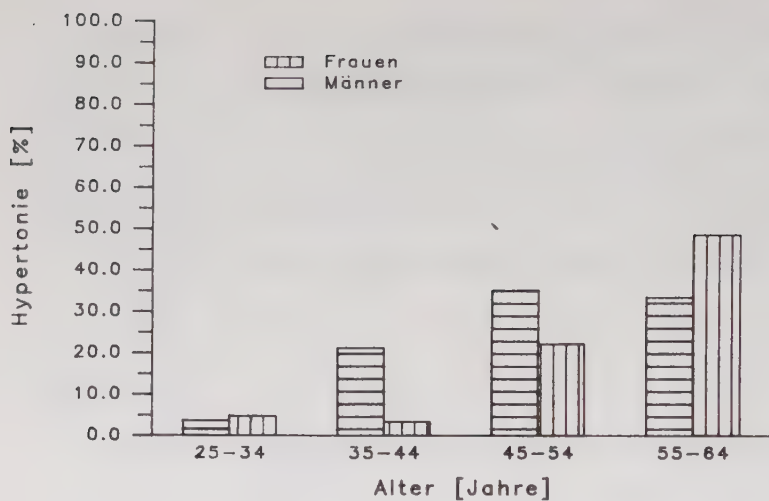


Abb. 16: Prävalenz der Hypertonie in der untersuchten Stichprobe nach Geschlecht und Alter.



Abb. 17: Prävalenz der Hypercholesterinämie in der untersuchten Stichprobe nach Geschlecht und Alter.



Abb. 18: Prävalenz des Rauchens in der untersuchten Stichprobe nach Geschlecht und Alter.

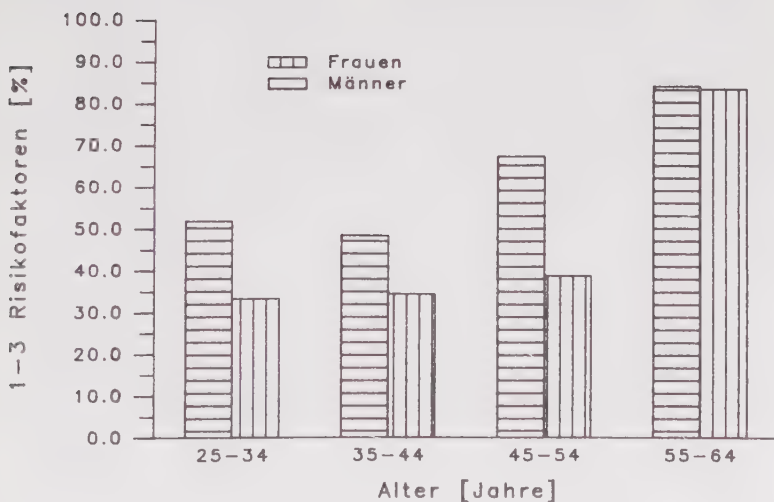


Abb. 19: Prävalenz der kumulierten Hauptrisikofaktoren (Hypertonie, Hypercholesterinämie, Rauchen) in der untersuchten Stichprobe nach Geschlecht und Alter.

Tabelle 2: Prävalenz der Hauptrisikofaktoren und ihrer Kombinationen

Zeilen- Nr.	Anzahl RF	Art RF	Männer		Frauen		Summe	
			n	%	n	%	n	%
1	0	-	48	35,3	60	51,3	108	42,7
2	1	H	21	15,4	11	9,4	32	11,5
3		C	15	11,0	14	12,0	29	11,5
4		R	29	21,3	14	12,0	43	17,0
5			65	47,8	39	33,3	104	41,1
6	2	H+C	3	2,2	9	7,7	12	4,7
7		H+R	6	4,4	3	2,6	9	3,6
8		C+R	10	7,4	3	2,6	13	5,1
9			19	14,0	15	12,8	34	13,4
10	3	H+C+R	4	2,9	2	1,7	6	2,4
11	?	R(+C?)	-	-	1*	0,9	1	0,4
12	1-3		88	64,7	57	48,7	145	57,3
13	alle Hypertoniker		34	25,0	25	21,4	59	23,3
14	alle Hyperchol.		32	23,5	28	24,1	60	23,8
15	alle Raucher		49	36,0	23	19,7	72	28,5
16	Summe		136	100,0	117	100,0	253	100,0

* = Raucherin mit normalem Blutdruck und fehlendem Cholesterinwert

RF = Risikofaktor

H = Hypertonie

C = Hypercholesterinämie

R = Rauchen

Erklärung der Summen in Tabelle 2:

$$5 = 2 + 3 + 4$$

$$9 = 6 + 7 + 8$$

$$12 = 5 + 9 + 10 + 11$$

$$13 = 2 + 6 + 7 + 10$$

$$14 = 3 + 6 + 8 + 10$$

$$15 = 4 + 7 + 8 + 10 + 11$$

$$16 = 1 + 5 + 9 + 10 + 11 = 1 + 12$$

Alle Prozentangaben beziehen sich auf die jeweilige Gesamtzahl der Probanden einer Spalte (Zeile 16).

3.1.2. AW in Abhängigkeit von Geschlecht und Alter

Abbildung 20 und Tabelle 3 zeigen die Mittelwerte des AW in den verschiedenen Untergruppen nach Geschlecht und Alter. Es fand sich eine Zunahme des mittleren AW mit dem Alter. Bei den Männern verteilt sich der Anstieg auf das gesamte Altersspektrum, wobei der größte Unterschied zwischen den beiden mittleren Altersgruppen zu beobachten ist. Dagegen besteht bei den Frauen zwischen den beiden jüngsten Gruppen kein Unterschied und der mittlere AW steigt erst in den höheren Gruppen zunächst leicht (45-54 Jahre) und dann stärker (55-64 Jahre) an. Der Unterschied zwischen Männern und Frauen ist in der Altersgruppe zwischen 25 und 34 Jahren nicht signifikant, dagegen in den drei anderen Altersstufen hochsignifikant. Die Zunahme des mittleren AW mit zunehmendem Alter bei Männern und Frauen ist ebenfalls statistisch gesichert (KRUSKALL-WALLIS-Test, $p < 0,05$).

Tabelle 3: AW nach Alter und Geschlecht

Altersgruppe [Jahre]		Männer	Frauen	p	Alle
25-34	$\bar{x}$	14,1	12,5	n.s.	13,4
	s	8,0	6,5		7,3
35-44	$\bar{x}$	17,6	12,0	**	15,0
	s	9,3	6,2		8,5
45-54	$\bar{x}$	26,6	14,3	***	20,6
	s	17,3	5,9		14,3
55-64	$\bar{x}$	31,1	22,0	**	27,1
	s	17,0	12,6		15,8
Alle	$\bar{x}$	23,2	15,5	***	19,6
	s	15,5	9,2		13,5

 $\bar{x}$ = Mittelwert

s = Standardabweichung

* p < 0,05

** p < 0,01

*** p < 0,001

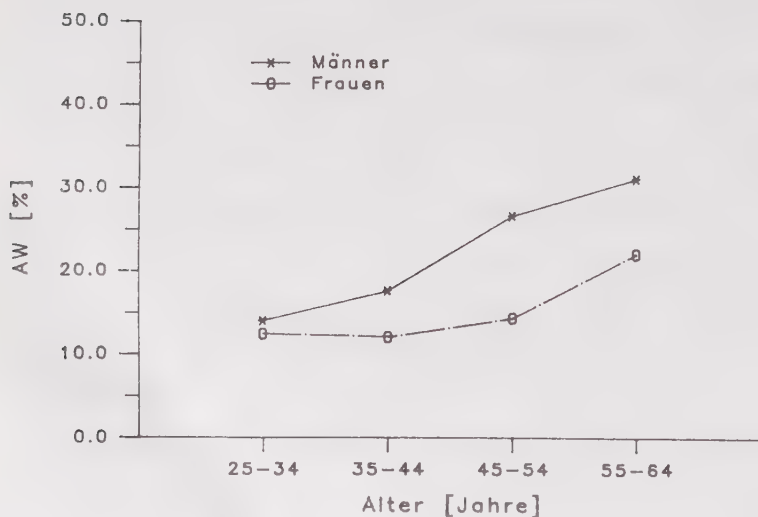


Abb. 20: Mittelwerte des AW nach Geschlecht und Alter (n=253).

Das Durchschnittsalter ist für Männer und Frauen in allen Altersgruppen nicht wesentlich verschieden. Damit ist ein Einfluß unterschiedlicher Altersverteilungen innerhalb der Klassen auf die geschlechtsspezifischen Mittelwerte des AW zumindest unwahrscheinlich. Ein solcher Störfaktor könnte ohnehin die beobachteten Unterschiede nicht hinreichend erklären, da der mittlere AW der Männer in allen Altersklassen nicht nur den der gleichaltrigen Frauen, sondern auch den der nächsthöheren Altersstufe der Frauen übertrifft.

3.1.3. AW und Hauptrisikofaktoren

Der Versuch, Assoziationen zwischen der Höhe des AW und einzelnen Risikofaktoren aufzudecken, stößt auf folgende Schwierigkeiten:

Angesichts der oben beschriebenen Prävalenzverhältnisse hat es wenig Sinn, nur nach einem Kriterium zu unterteilen (z.B. Hypertoniker/Normotoniker oder Raucher/Nichtraucher), da hierbei keine einheitlichen Untergruppen erhalten werden. So finden sich in einer Gruppe, die für den jeweiligen Risikofaktor negativ ist (z.B. Normotoniker oder Nichtraucher), immer auch Probanden, die einen oder zwei andere Risikofaktoren aufweisen. Auch von den jeweiligen Risikofaktor-positiven Probanden ist immer ein Teil durch ein oder zwei weitere Risikofaktoren zusätzlich belastet. Es müssen deshalb homogenere Gruppen definiert werden, die jeweils nur den einen interessierenden Risikofaktor (z.B. Nur-Hypertoniker, Nur-Raucher) bzw. gar keinen Risikofaktor aufweisen.

Da die Prävalenz der Hypertonie und der Hypercholesterinämie

mit dem Alter zunimmt, haben die Hypertoniker bzw. Hypercholesterinämiker ein höheres Durchschnittsalter als die Probanden ohne Risikofaktoren. Um die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Risikofaktoren und AW von Alterseinflüssen freizuhalten, müssen deshalb die einzelnen Altersgruppen getrennt betrachtet werden. Raucher und Nichtraucher unterscheiden sich dagegen in ihrem Durchschnittsalter nicht wesentlich (Raucherinnen sind im Durchschnitt eher jünger als Nichtraucherinnen), so daß hier ein Zusammenfassen aller Altersgruppen gerechtfertigt erscheint. Einen Überblick über das Durchschnittsalter in den einzelnen Risikofaktorgruppen gibt Tabelle 4.

Tabelle 4: Durchschnittsalter in definierten Untergruppen

Risikofaktoren [Art bzw. Anzahl]	Alter [Jahre]	
	Männer	Frauen
keine Risikofaktoren	42,1	42,9
nur Hypertonie	51,8	52,9
nur Hypercholesterinämie	50,6	54,8
nur Rauchen	43,4	39,9
1-3 Risikofaktoren	48,8	50,3

Als Folge der genannten Einschränkungen sind die Probandenzahlen in den definierten Untergruppen relativ klein und infolgedessen die beobachteten Unterschiede in der Höhe des mittleren AW in den meisten Fällen statistisch nicht signifikant. Erst durch Bildung von Gruppen mit und ohne Risikofaktoren durch Kumulation der einzelnen Risikofaktoren werden zumindest teilweise Gruppenstärken erreicht, die eine statistische Absicherung der Unterschiede erlauben. Eine getrennte Betrachtung nach der Anzahl der Risikofaktoren ist wegen der geringen Zahl der Probanden mit zwei oder drei Risikofaktoren in den einzelnen Untergruppen nach Geschlecht und Alter nicht sinnvoll.

In Abbildung 21 (a und b) sowie Tabelle 5 (a und b) sind die altersspezifischen Mittelwerte des AW für Probanden ohne Risikofaktoren, Nur-Hypertoniker, Nur-Hypercholesterinämiker, Nur-Raucher und die Gesamtgruppe mit kumulierten Risikofaktoren dargestellt. Bei Zusammenfassung der Altersgruppen (äußerste rechte Spalte in Tabelle 5) sind zwar die Mittelwerte aller Risikogruppen im Vergleich zur Normalgruppe signifikant erhöht (Ausnahme: Raucherinnen), andererseits ist aber auch das Durchschnittsalter in den Risikogruppen deutlich höher (siehe oben, Tabelle 4). Lediglich die männlichen Raucher haben ein etwa gleiches Durchschnittsalter wie die Probanden ohne Risikofaktoren, so daß hier der Vergleich aussagefähig ist. In den einzelnen Altersklassen sind die Unterschiede bis auf wenige Ausnahmen nicht signifikant. Es ist jedoch ein durchgehender Trend zu höheren Werten in den Risikogruppen festzustellen. Nicht ganz konsistent, aber doch erkennbar sind die zunehmende Tendenz mit dem Alter und das höhere Niveau bei den Männern gegenüber den Frauen.

Tabelle 5: Mittelwerte des AW in definierten Untergruppen nach Geschlecht, Alter und Risikofaktorprävalenz.

a		Männer				
		Altersgruppe [Jahre]				
RF		25-34	35-44	45-54	55-64	Alle
keine RF	$\bar{x}$	10,6	16,3	20,3	20,7	16,3
	s	5,8	8,0	10,6	6,4	8,8
	n	13	17	12	6	48
nur H	$\bar{x}$	11,3	18,8	32,5	25,7	26,0 **
	s	-	5,6	19,2	14,9	5,1
	n	1	4	7	9	21
nur C	$\bar{x}$	29,0 *	23,6	22,7	26,5	25,2 *
	s	10,4	11,0	21,3	21,9	18,1
	n	2	2	5	6	15
nur R	$\bar{x}$	15,7	19,5	28,6	35,5 *	24,3 *
	s	7,0	16,0	24,9	14,7	16,1
	n	11	5	4	9	29
1-3 RF	$\bar{x}$	17,3 *	19,1	29,7	32,9	27,0 ***
	s	8,5	10,6	19,2	17,7	17,0
	n	14	16	25	33	88

RF = Risikofaktor(en), R = Zigarettenrauchen,

H = Hypertonie ($RR_{\text{syst.}} > 160$ mm Hg bzw. $RR_{\text{diast.}} > 95$ mm Hg),

C = Hypercholesterinämie (> 260 mg/dl = $6,72$ mmol/l),

$\bar{x}$ = Mittelwert, s = Standardabweichung, n = Anzahl der Probanden

b Frauen

		Altersgruppe [Jahre]				
RF		25-34	35-44	45-54	55-64	Alle
keine RF	$\bar{x}$	11,9	10,2	13,2	19,9	12,5
	s	6,9	3,8	6,1	12,5	6,7
	n	14	19	22	5	60
nur H	$\bar{x}$	10,4	-	16,1	28,5	22,3 **
	s	-	-	6,2	13,0	12,2
	n	1	-	4	6	11
nur C	$\bar{x}$	21,4	17,5	14,2	22,5	19,7 **
	s	-	-	2,8	18,7	14,3
	n	1	1	4	8	14
nur R	$\bar{x}$	12,3	15,2	19,0	11,3	14,3
	s	8,2	8,8	3,9	3,1	7,3
	n	4	6	2	2	14
1-3 RF	$\bar{x}$	13,5	15,6	16,1 *	22,4	18,6 ***
	s	6,8	8,4	5,3	12,9	10,5
	n	7	10	14	26	57

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$

(U-Test von WILCOXON, MANN und WHITNEY [77], jeweils im Vergleich zur Gruppe ohne Risikofaktoren)

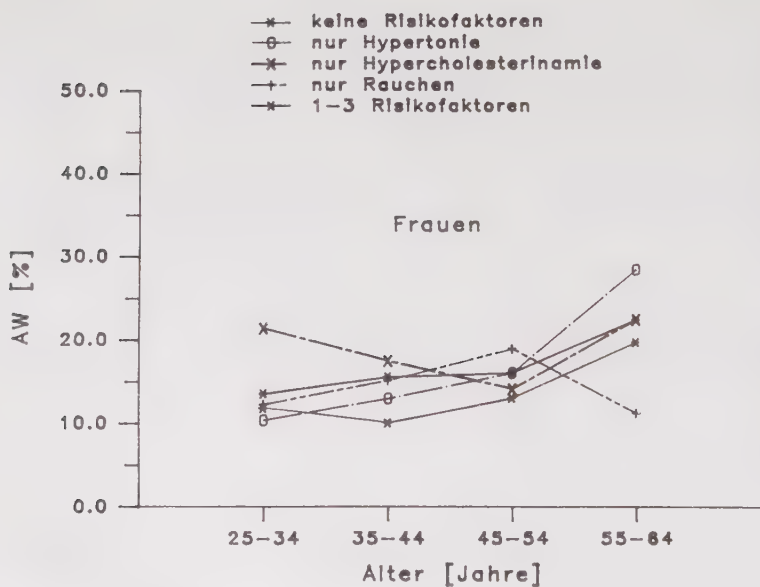
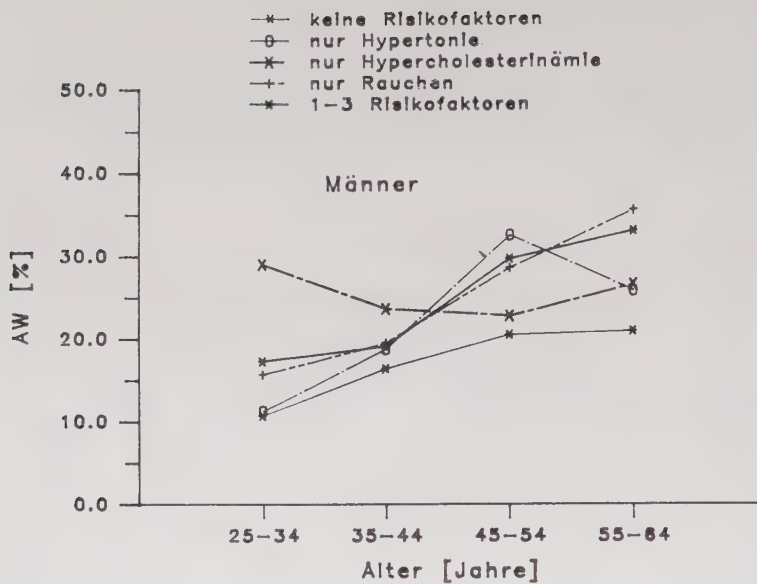


Abb. 21: Mittelwerte des AW für Männer (a) und Frauen (b) in Abhängigkeit vom Alter und von der Prävalenz einzelner bzw. kumulierter Hauptrisikofaktoren.

3.1.4. AW und hormonelle Kontrazeption

22,0 % (11 von 50) der Frauen im Alter zwischen 25 und 44 Jahren gaben an, ein hormonelles Kontrazeptivum einzunehmen. In dieser Untergruppe ist der mittlere AW signifikant höher als bei den gleichaltrigen Frauen ohne Hormoneinnahme (Tabelle 6). Allerdings haben 8 der 11 Frauen (=72,7 %), die die Pille nehmen, einen Risikofaktor (6 mal Rauchen, 1 mal Hypercholesterinämie, 1 mal Rauchen + Hypercholesterinämie) gegenüber nur 9 von 39 Frauen ohne Hormoneinnahme (23,1 %). Betrachtet man nur die Frauen ohne Hauptrisikofaktoren, so findet sich ebenfalls ein höherer mittlerer AW bei den Frauen, die die Pille nehmen, im Vergleich zu denen, die keine Hormone nehmen (Tabelle 6). Dieser Unterschied ist trotz der kleinen Gruppenstärke statistisch signifikant.

Die in Tabelle 5b angegebenen Mittelwerte verändern sich nur unwesentlich, wenn die Frauen, die die Pille nehmen, nicht berücksichtigt werden; alle statistischen Vergleiche bleiben unverändert.

3.1.5. Multivariate Analyse der Korrelationen zwischen AW und kardiovaskulären Risikofaktoren bzw. Risikoindikatoren

Für die multiple Korrelationsanalyse wurden nur Probanden berücksichtigt, bei denen Werte für alle Variablen aller untersuchten Modelle vorlagen. Dies trifft für 127 Männer und 105 Frauen zu.

Tabelle 6: Mittlerer AW bei 25-44jährigen Frauen mit und ohne Einnahme von hormonellen Kontrazeptiva.

Altersgruppe		AW [%]		
[Jahre]		mit Pille	ohne Pille	
25-34	$\bar{x}$	17,1	10,6	*
	s	7,2	5,4	
	n	6	15	
35-44	$\bar{x}$	17,7	10,8	*
	s	6,5	5,6	
	n	5	24	
25-44	$\bar{x}$	17,4	10,8	**
	s	6,6	5,4	
	n	11	39	
25-44 (ohne RF)	$\bar{x}$	18,9	10,11	*
	s	2,9	4,6	
	n	3	30	

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$

(U-Test nach WILCOXON, MANN und WHITNEY [77],

jeweils Vergleich mit/ohne Pille)

$\bar{x}$ = Mittelwert, s = Standardabweichung,

n = Anzahl der Probanden

Um die Frage zu klären, welcher Anteil der Variabilität des AW durch die Variabilität kardiovaskulärer Risikofaktoren bzw. anderer möglicher Risikoindikatoren erklärt werden kann, wurden vier verschiedene, stufenweise aufeinander aufbauende Modelle untersucht. Tabelle 7 gibt eine Übersicht über die in den einzelnen Modellen berücksichtigten Variablen. In die endgültigen Modelle wurden nur diejenigen Variablen aus der jeweiligen Ausgangsliste aufgenommen, die einen signifikanten Beitrag zur Erklärung der Variabilität des AW leisteten. Jedes Modell wurde getrennt für Männer und Frauen analysiert. Die endgültigen Modelle sind in den Tabellen 8a und 8b angegeben.

Modell 1 sollte den durch das Alter und die drei Hauptrisikogrößen Blutdruck, Serumcholesterin und Zigarettenkonsum alleine erklärten Anteil der Variabilität des AW aufdecken. Im Modell 2 wurde das als Risikoindikator für die koronare Herzerkrankung gut gesicherte HDL-Cholesterin, die Harnsäurekonzentration im Serum, der Body Mass Index (BMI) als Übergewichtsvariable und der tägliche Alkoholkonsum hinzugenommen. Dabei war besonders von Interesse, ob zwischen diesen Variablen und dem AW unabhängige Beziehungen existieren oder ob beispielsweise die Assoziation zwischen AW und BMI über einen oder mehrere der anderen Faktoren vermittelt ist (Blutdruck, Cholesterin, HDL). Der Alkoholkonsum wurde mit aufgenommen, obwohl seine einfache Korrelation mit dem AW nahe Null war, da es sich um eine unterdrückte Beziehung handeln konnte. Positive Assoziationen mit dem Alkoholkonsum sind sowohl für den Blutdruck als auch für das HDL-Cholesterin bekannt.

Tabelle 7: Überblick über die in der multiplen Korrelationsanalyse untersuchten Modelle.

Modell	mögliche Variablen im Modell
Modell 1	Alter Blutdruck Cholesterin Zigaretten
Modell 2	Alter Blutdruck Cholesterin Zigaretten HDL Harnsäure Body Mass Index Alkohol
Modell 3	Alter Blutdruck Cholesterin Zigaretten HDL Harnsäure Body Mass Index Alkohol Protein
Modell 4	Alter Blutdruck Cholesterin Zigaretten HDL Harnsäure Body Mass Index Alkohol Protein Plasmaviskosität

In den Modellen 3 und 4 wurden nacheinander zwei mit dem AW möglicherweise verwandte Parameter mit hämorheologischer Bedeutung hinzugenommen, die Gesamtproteinkonzentration im Serum und die Plasmaviskosität. Dadurch sollte abgeschätzt werden, inwieweit diese Methoden gleiche oder ähnliche Informationen liefern. Wenn z.B. die Plasmaviskosität ein anderes Maß für die gleichen Plasmafaktoren wäre, die auch für die Erythrozytenaggregation verantwortlich sind, dann müßte in einem Modell, das die Plasmaviskosität enthält, ein sehr großer Teil der Variabilität des AW erklärt werden.

In den Tabellen 8a (Männer) und 8b (Frauen) sind die Ergebnisse der multiplen linearen Korrelationsanalyse zusammengefaßt. Für jedes Modell sind die partiellen Korrelationskoeffizienten der Variablen mit dem AW für das endgültige Modell, das jeweils die unterstrichenen Variablen enthält, angegeben. Die Korrelationskoeffizienten zwischen dem AW und den Variablen, die im jeweiligen Modell per definitionem nicht berücksichtigt wurden (vgl. Tabelle 7), stehen in Klammern.

In der zweiten Spalte der Tabellen 8a und 8b sind die einfachen (bivariaten) linearen Korrelationskoeffizienten aufgelistet. Der höchste Wert fand sich sowohl bei Männern wie bei Frauen für die Beziehung zwischen AW und Plasmaviskosität mit ca. 0,65. Auch die Werte für die Assoziationen zwischen AW und Serumprotein, Harnsäure und HDL-Cholesterin sind bei Männern und Frauen etwa gleich. Dagegen ist der Zusammenhang mit dem systolischen Blutdruck, dem Gesamtcholesterin im Serum und dem Body Mass Index bei den Frauen enger, während das Lebensalter und der Zigarettenkonsum bei

Tabelle 8: Partielle Korrelationskoeffizienten zwischen dem AW und den in der multiplen Korrelationsanalyse eingesetzten Variablen.

a Männer (n = 127)				
Variable	bivariat	Modell 1	Modell 2	Modell 3
Alter	0,4725***	<u>0,4200***</u>	<u>0,4189***</u>	<u>0,5243***</u>
Blutdruck	0,3070***	<u>0,2210*</u>	<u>0,2755**</u>	<u>0,2307*</u>
Cholesterin	0,2771**	0,1458	0,1406	0,0314
Zigaretten	0,1764*	<u>0,2484**</u>	<u>0,2463**</u>	<u>0,2782**</u>
HDL	-0,2588**	(-0,3137***)	<u>-0,3137***</u>	<u>-0,4253***</u>
BMI	0,2766**	(0,1865*)	0,0890	0,1224
Harnsäure	0,3526***	(0,2331**)	0,1757	0,1071
Alkohol	0,0560	(-0,0092)	0,0468	-0,0062
Protein	0,3343***	(0,4307***)	(0,5099***)	<u>0,5099***</u>
Plasmavisk.	0,6356***	(0,5758***)	(0,5738***)	(0,3885***)
multipl. r		0,5434***	0,6039***	0,7279***
multipl. R ²		0,2953	0,3647	0,5299

* p < 0,05 ** p < 0,01 *** p < 0,001

Frauen (n = 105)

Variable	bivariat	Modell 1	Modell 2	Modell 3	Modell 4
Alter	0,4174***	0,1235	0,0068	0,0687	0,0550
Blutdruck	0,4061***	<u>0,2726**</u>	0,1486	0,1038	0,0639
Cholesterin	0,4519***	<u>0,3434***</u>	<u>0,4662***</u>	<u>0,4603***</u>	<u>0,3524***</u>
Zigaretten	0,0483	0,1315	0,1374	0,1969	0,1552
HDL	-0,2560**	(-0,3447***)	-0,3288***	-0,3769***	-0,3014**
BMI	0,4416**	(0,3396***)	<u>0,3903***</u>	<u>0,3759***</u>	<u>0,3096**</u>
Harnsäure	0,3765***	(0,3396***)	0,1343	0,1493	0,0712
Alkohol	-0,1469	(-0,1123)	-0,0315	-0,0952	-0,0771
Protein	0,3601***	(0,3016**)	(0,3677***)	<u>0,3677***</u>	-0,0497
Plasmavisk.	0,6760***	(0,5914***)	(0,5694***)	(0,4695***)	<u>0,5694***</u>
multipl. r		0,5132***	0,6374***	0,6976***	0,7738***
multipl. R ²		0,2634	0,4063	0,4866	0,5988

Die unterstrichenen Variablen wurden jeweils in das endgültige Modell aufgenommen; die eingeklammerten Variablen sind in dem jeweiligen Modell per definitionem nicht enthalten (vgl. Tabelle 6). r = Korrelationskoeffizient, R^2 = Bestimmtheitsmaß.

den Männern enger mit dem AW korrelieren als bei den Frauen. Der Alkoholkonsum ist in beiden Gruppen nicht signifikant mit dem AW assoziiert.

In den multivariaten Modellen treten die Unterschiede zwischen Männern und Frauen noch deutlicher hervor. Während das Lebensalter bei den Männern in allen Modellen hochsignifikant mit dem AW korreliert ist, sinkt der Koeffizient bei den Frauen auf ein nicht signifikantes Niveau ab, sobald Blutdruck und Cholesterin zusätzlich berücksichtigt werden. Umgekehrt besteht bei den Frauen in allen Modellen ein enger Zusammenhang zwischen AW und Cholesterin, bei den Männern jedoch nicht.

Der auffälligste Befund ist die bei beiden Geschlechtern hochsignifikante negative Korrelation zwischen AW und HDL-Cholesterin, die sehr stabil ist und in allen Modellen besteht. Die Stärke dieser Beziehung wird offenbar in der einfachen Korrelation unterschätzt, denn die Werte in den multivariaten Modellen liegen durchweg höher.

Ähnliches gilt für die Beziehung zwischen AW und Zigarettenkonsum, die bei der einfachen Korrelation ebenfalls durch andere Variablen abgeschwächt erscheint. Hierfür dürfte das im Durchschnitt niedrigere Alter der Raucher verantwortlich sein. Bei den Männern leistet der Zigarettenkonsum in allen Modellen einen signifikanten Beitrag zur Erklärung der Variabilität des AW. Bei den Frauen tritt der Effekt des Rauchens ebenfalls stärker hervor als bei der einfachen Korrelation, erreicht jedoch nicht statistische Signifikanz.

Die relativ starke bivariate Assoziation zwischen AW und Harnsäure im Serum scheint bei Männern und Frauen durch an-

dere Variablen vermittelt zu sein. In keinem der multivariaten Modelle ist der Beitrag der Harnsäure signifikant.

Der Alkoholkonsum ist in keinem der untersuchten Modelle mit dem AW korreliert.

Der Body Mass Index zeigt vor allem bei Frauen eine enge unabhängige Beziehung zum AW.

Die Proteinkonzentration im Serum ist bei Männern und Frauen signifikant mit dem AW korreliert. Diese Beziehung wird bei den Männern abgeschwächt, wenn die Plasmaviskosität mit in das Modell aufgenommen wird, bei den Frauen verschwindet sie völlig.

Das Quadrat des multiplen Korrelationskoeffizienten zwischen dem AW und den jeweils im Modell befindlichen Variablen ist ein Maß für den durch das Modell erklärten Anteil der Variabilität des AW; es wird auch als multiples Bestimmtheitsmaß bezeichnet [77]. Durch die drei Hauptrisikovariablen Blutdruck, Serumcholesterin und Zigarettenkonsum sowie das Lebensalter können nur 25-30 % der Varianz des AW erklärt werden (Modell 1). Durch Hinzunahme von HDL-Cholesterin, Harnsäure, Body Mass Index und Alkoholkonsum erhöht sich dieser Wert auf etwa 40 % (Modell 2). Die Zunahme von R^2 auf etwa 50 % in Modell 3 zeigt an, daß auch die Proteinkonzentration im Serum einen Teil der für die Variabilität des AW verantwortlichen Faktoren erfaßt. In Modell 4 kommt die Plasmaviskosität hinzu, wodurch sich das Bestimmtheitsmaß auf etwa 60 % erhöht.

Selbst im Modell 4, in dem die wichtigsten kardiovaskulären Risikofaktoren und zusätzlich zwei hämorheologische Parameter berücksichtigt sind, bleiben also etwa 40 % der Varianz

des AW unerklärt.

Werden Männer und Frauen in der multivariaten Analyse zusammengefaßt und das Geschlecht als zusätzliche potentielle Prädiktorvariable eingeführt, so zeigt sich kein signifikanter Beitrag des Geschlechts. Der Unterschied in der Höhe des AW zwischen Männern und Frauen scheint demnach nicht auf einen spezifischen Effekt des Geschlechts, sondern auf der unterschiedlichen Ausprägung von Risikovariablen zu beruhen. Angesichts der komplexen Interkorrelationen der möglichen Prädiktorvariablen untereinander, die sich in den teilweise sehr starken Schwankungen ihrer partiellen Korrelationskoeffizienten mit dem AW (je nach Modell) ausdrücken, ist es nicht möglich, den unabhängigen Beitrag einzelner Größen zur Variabilität des AW anzugeben. Die partiellen Korrelationskoeffizienten beziehen sich stets auf den Teil der Varianz des AW, der nicht durch die Variabilität der anderen im Modell enthaltenen Variablen erklärt werden kann. Inwieweit der Effekt einer Größe mit signifikanter partieller Korrelation zum AW teilweise auch über andere Größen im Modell eingeht, bleibt offen. Derartige Fragen müssen an homogenen Gruppen untersucht werden, was jedoch im vorliegenden Fall wegen der relativ geringen Probandenzahl nicht möglich ist.

3.2. In vitro Versuche zum Mechanismus des AW

3.2.1. AW und Phosphorylierungsgrad des Fibrinogens

Die Tabelle 9 zeigt, daß nach Zugabe von Fibrinogen mit hohem bzw. niedrigem Phosphorylierungsgrad am Fibrinopeptid A der AW jeweils deutlich anstieg und daß bei gleicher Menge an zugegebenem Fibrinogen kein Unterschied zwischen den beiden Proben bestand. Dabei war in den Proben mit HP-Fibrinogen der Phosphorylierungsgrad rechnerisch 2-3 mal so hoch wie in den Proben mit LP-Fibrinogen (Tabelle 9).

3.2.2. AW nach Inkubation von Plasma bzw. Zugabe von Lysolecithin

Die Abbildungen 22a und 22b zeigen die Veränderung des AW in 2 Plasmaproben während einer mehrstündigen Inkubation des Plasmas bei 37° C im Vergleich zu homologen Kontrollproben, die bei Raumtemperatur aufbewahrt wurden. Außerdem sind die Aggregationswerte nach Zugabe von Lysolecithin zu Plasma dargestellt. Bei Aufbewahrung bei Raumtemperatur über 6 Stunden fand sich keine wesentliche Änderung des AW. Dagegen bewirkte Inkubation bei 37° C einen Abfall des AW, der mit zunehmender Inkubationsdauer immer ausgeprägter wurde. Zugabe von Lysolecithin in einer Konzentration von 1 mg/ml ohne Inkubation hatte eine vollständige Hemmung der Aggregation zur Folge. Unterschiedliche Wirkung zeigte Lysolecithin bei einer 10fach niedrigeren Konzentration (0,1 mg/ml):

Tabelle 9: AW und Phosphorylierungsgrad des Fibrinogens

Versuch I	P	AW [%]
Plasma	25 %	17,3
Plasma + 2,27 g/l HP-Fibrinogen	34 %	52,6
Plasma + 2,27 g/l LP-Fibrinogen	17 %	54,7

Versuch II	P	AW [%]
Plasma	25 %	36,5
Plasma + 2,0 g/l HP-Fibrinogen	34 %	57,0
Plasma + 2,0 g/l LP-Fibrinogen	17 %	57,1

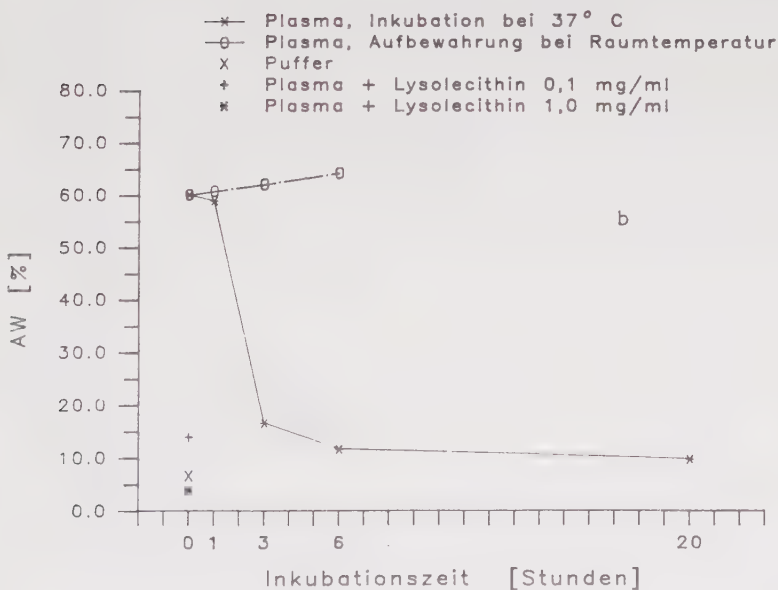
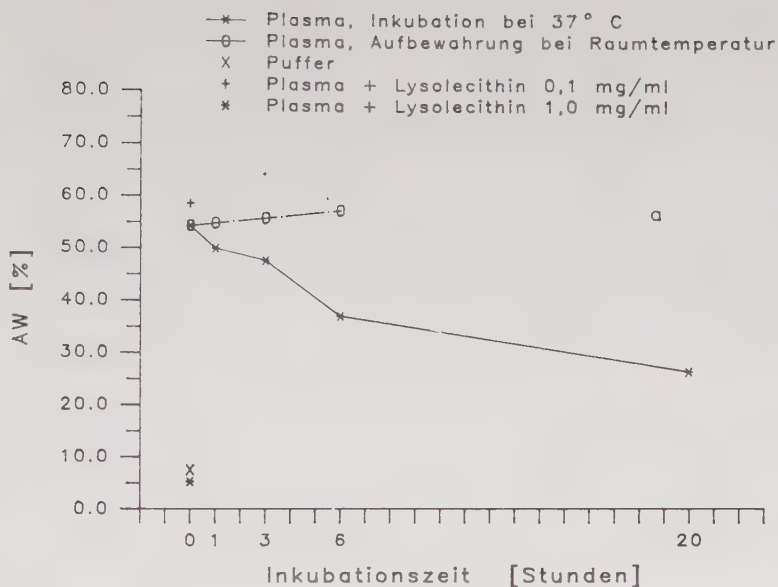
HP-Fibrinogen = Fibrinogen-Präparation mit hohem Anteil an phosphoryliertem Fibrinogen

LP-Fibrinogen = Fibrinogen-Präparation mit niedrigem Anteil an phosphoryliertem Fibrinogen

P = Phosphorylierungsgrad (Anteil an phosphoryliertem Fibrinogen)

(zur Abschätzung der Phosphorylierungsgrade in den Proben vgl. Abschnitt 2.3.1.)

Abb. 22: Veränderung des AW nach mehrstündiger Inkubation von Plasma bei 37°C bzw. Zugabe von Lysolecithin zum Plasma in 2 Proben mit erhöhtem AW (Patienten mit kurz zurückliegendem Herzinfarkt).



Keine Hemmung der einen Probe (Patient I) im Gegensatz zu nahezu vollständiger Hemmung der zweiten Probe (Patient II). Auch waren das Ausmaß und der zeitliche Verlauf der inkubationsbedingten AW-Hemmung in den beiden Proben sehr unterschiedlich.

Unter Berücksichtigung dieser Befunde wurde bei den Versuchen mit Neuraminidase-Behandlung des Plasmas nicht bei 37° C, sondern bei Raumtemperatur inkubiert.

3.2.3. AW nach Neuraminidase-Behandlung von Plasma

Aufgrund der in Abschnitt 2.3.3. beschriebenen methodischen Schwierigkeiten ist nur ein sehr kleiner Teil der durchgeführten Versuche überhaupt auswertbar. Durch dreistündige Inkubation des Plasmas mit immobilisierter Neuraminidase bei Raumtemperatur konnten etwa 50-75 % der durch saure Hydrolyse (pH 1,0-1,5, 80° C, 50 min) freisetzbaren Neuraminsäuren abgespalten werden.

Die AW-Messung im behandeltem Plasma führte zu keinen eindeutigen Ergebnissen. Ein typisches Experiment ist in Tabelle 10 dargestellt. Zwar ist der AW in der mit Neuraminidase inkubierten Probe niedriger als in der Kontrollprobe mit reinem Plasma, jedoch ist der Abfall in der direkten Kontrolle, die mit inerter Agarose inkubiert wurde, genauso stark, so daß nicht klar ist, ob der Abfall des AW auf die Neuraminidase-Behandlung zurückzuführen ist.

Tabelle 10: AW nach Neuraminidase-Behandlung von Plasma

Probe	AW [%]
Plasma	25,6
Plasma + 0,5 U/ml immob. Neuraminidase *	17,1
Plasma + inerte Agarose *	16,2
Plasma *	22,2

* 3 Stunden bei Raumtemperatur bei 8 min⁻¹ rotiert

3.2.4. Versuche mit Thrombozyten

Weder nach chemischer Aktivierung mit dem Calcium-Ionophor A23187 noch nach mechanischer Zerstörung durch Ultraschallbehandlung fand sich eine wesentliche Veränderung des AW in den Überständen von plättchenreichem Plasma (PRP) bzw. einer konzentrierten Suspension von gewaschenen Thrombozyten in Puffer im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollproben (Tabelle 11).

Zugabe von L-Lysin oder Glucosamin oder Galactosamin in einer Konzentration von 30 mmol/l senkte weder einen normalen noch einen erhöhten AW in PPP noch den AW in Überständen von PRP oder Thrombozytenkonzentrat nach Behandlung mit A23187 oder Ultraschall. L-Lysin zeigte in einem Versuch eine leichte AW-steigernde Wirkung in normalem PPP und in PPP aus A23187-behandeltem PRP. Zugabe von Galactosamin bewirkte eine deutliche Zunahme des AW in normalem PPP (Tabelle 11).

Normales PPP, dem 100 μ l des Überstandes von Ultraschall-behandeltem Thrombozytenkonzentrat zugegeben worden waren, zeigte keinen Unterschied zur Kontrolle, der Puffer zugeetzt wurde (Tabelle 11).

Tabelle 11: AW in Überständen von plättchenreichem Plasma (PRP) bzw. Thrombozytenkonzentrat nach chemischer Aktivierung (Calcium-Ionophor A23187) bzw. mechanischer Zerstörung (Ultraschallbehandlung) der Thrombozyten sowie in Plasma nach Zugabe von basischen Aminosäuren oder Hexosaminen. PPP = platelet poor plasma.

Probe	AW [%]		
	I	II	III
Plasma (PPP)	16,8	39,7	15,2
Serum	5,4	-	-
Puffer	3,6	4,7	5,3
PPP aus A23187-aktiviertem (1 µg/ml) PRP	18,9	-	-
Puffer + A23187 (1 µg/ml)	4,4	-	-
Überstand von Thrombozytenkonzentrat in Puffer nach Aktivierung mit A23187 (50 µg/ml)	-	3,4	-
PPP aus Ultraschall-behandeltem PRP	-	-	18,0
Überstand von Ultraschall-behandeltem Thrombozytenkonzentrat in Puffer	-	-	5,6
Plasma + 100 µl Puffer	-	-	11,4
Plasma + 100 µl Überstand von Ultraschall-behandeltem Thrombozytenkonzentrat in Puffer	-	-	11,3
Plasma + 30 mM L-Lysin	24,8	39,6	-
PPP aus A23187-aktiviertem (1 µg/ml) PRP + 30 mM L-Lysin	24,9	-	-
Puffer + 30 mM L-Lysin	4,4	-	-
Plasma + 30 mM Glucosamin	-	36,5	-
Plasma + 30 mM Galactosamin	-	50,7	-

4. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

4.1. AW-Bestimmungen im Rahmen des MONICA-Projektes Augsburg

4.1.1. Zur Frage der Repräsentativität der untersuchten Stichprobe

Die Frage, inwieweit die an der untersuchten Stichprobe gefundenen Ergebnisse auf die Bevölkerung verallgemeinert werden dürfen, ist aus verschiedenen Gründen problematisch. Zunächst ist festzustellen, daß aufgrund der Anlage der MONICA-Studie schon die Gesamtstichprobe der 1. Querschnittsstudie nicht im engeren Sinne repräsentativ für die Bevölkerung des Studiengebietes als Ganzes ist. Die gesamte Studie und damit auch die Ziehung der Stichprobe war von vorneherein nicht auf Aussagen über die Gesamtbevölkerung angelegt, sondern auf Aussagen über einzelne Alters- und Geschlechtsgruppen im Bereich zwischen 25 und 64 Jahren. Deshalb wurde eine geschichtete Stichprobe mit gleichen, ausreichend großen Probandenzahlen in den Untergruppen gezogen. Für die vorliegende Untersuchung ergibt sich daraus die Schwierigkeit, daß die untersuchte Teilstichprobe ebenfalls als geschichtet anzusehen ist und entsprechend eigentlich nur gruppenspezifisch auswertbar ist, andererseits jedoch die Gruppenstärken meist nicht für eine statistische Absicherung der beobachteten Unterschiede ausreichen, insbesondere wenn zur Untersuchung einzelner Zusammenhänge in Stratifizierungsmodellen weitere Unterteilungen der Gruppen,

z.B. nach der Prävalenz bestimmter Risikofaktoren, notwendig sind.

Außerdem ist aufgrund des organisatorischen Ablaufs der vorliegenden Studie nicht ohne weiteres von einem rein zufälligen Zustandekommen der untersuchten Teilstichprobe auszugehen. Andererseits sind auch keine systematischen Verzerrungen infolge der zeitlichen und örtlichen Beschränkungen evident.

Anhaltspunkte dafür, inwieweit die untersuchte Stichprobe ein Abbild der Gesamtstichprobe ist, können z.B. Vergleiche der Verteilung der Probanden auf die Untergruppen oder von alters- und geschlechtsspezifischen Prävalenzdaten oder Mittelwerten einzelner Risikofaktoren liefern. Ein Vergleich dieser Kennwerte der untersuchten Stichprobe mit denen der Gesamtpopulation der MONICA-Teilnehmer zeigte zwar Abweichungen in den Zahlenwerten, die Grundtendenzen wie z. B. die niedrigeren Teilnehmerzahlen in den jüngeren Altersgruppen oder die altersabhängige Zunahme von Hypertonie und Hypercholesterinämie und die spezifischen Verlaufscharakteristiken wie z.B. der steile Anstieg von Prävalenzraten und Mittelwerten bei Frauen nach der Menopause waren jedoch auch in der Teilstichprobe deutlich ausgeprägt.

Grobe Verzerrungen liegen demnach offenbar nicht vor. Es scheint somit gerechtfertigt, die gefundenen Ergebnisse zwar nicht als exakte Zahlenwerte, aber doch in der Tendenz zu verallgemeinern. Zumindest können daraus Arbeitshypothesen entwickelt werden, die dann in größeren bzw. gezielt geplanten Untersuchungen überprüft werden müssen.

4.1.2. AW und kardiovaskuläre Risikofaktoren

4.1.2.1. Stratifizierungsmodell

Die in früheren klinischen Studien [8-11] gefundene positive Assoziation zwischen dem AW und kardiovaskulären Risikofaktoren konnte an einem unausgewählten Kollektiv bestätigt werden. Die beobachtete Erhöhung des mittleren AW bei Probanden mit einem oder mehreren der drei Hauptrisikofaktoren Hypertonie, Hypercholesterinämie und Rauchen war jedoch unter Beachtung des Einflusses von Geschlecht und Alter nicht in allen Untergruppen statistisch signifikant. Dagegen waren die Effekte von Geschlecht und Alter signifikant, wobei sich allerdings die einzelnen Gruppen hinsichtlich der Risikofaktorprävalenz unterschieden.

Die bei Frauen mit Einnahme hormoneller Kontrazeptiva gefundene signifikante Erhöhung des AW spricht für einen Zusammenhang zwischen dem Hormonhaushalt und der Erythrozytenaggregation. Ob hierbei die gleichen Mechanismen verantwortlich sind wie bei der bekannten AW-Erhöhung während der Schwangerschaft [102], ist unklar. Es wäre interessant, zu untersuchen, ob diese Wirkung dosisabhängig ist.

Angesichts des komplexen Zusammentreffens verschiedener Variablen ist die vorliegende Stichprobe zu klein für eine Untersuchung einzelner Effekte anhand von Stratifizierungsmodellen. Soweit überhaupt homogene Gruppen erhalten werden, sind die Probandenzahlen nicht ausreichend.

4.1.2.2. Multivariate Analyse

In zahlreichen klinischen und epidemiologischen Untersuchungen wurde eine negative Assoziation zwischen der Konzentration der High Density Lipoproteine (HDL) im Serum und der koronaren Herzkrankheit gefunden [3,4,5,28,30,46,61,62,63,91,103,105]. HDL gilt als antiatherogener Schutzfaktor. Diese Eigenschaft wird durch die Rolle der HDL beim Transport von Cholesterin von peripheren Geweben zur Leber erklärt [5,56,86].

Nachdem in früheren klinischen Studien eine positive Beziehung zwischen dem AW und der koronaren Herzkrankheit gesichert werden konnte [8-11,67,71,72,75,76], ist zur widerspruchsfreien Einordnung des AW in das konventionelle Risikofaktorenkonzept eine negative Assoziation zwischen AW und HDL-Cholesterin zu erwarten bzw. zu fordern.

An einer kleinen Gruppe von Patienten mit koronarer Herzkrankheit ist eine solche negative Korrelation bereits gefunden worden [67]. In der vorliegenden Untersuchung wurde erstmals an einer größeren Probandenzahl eine unabhängige negative Assoziation zwischen dem AW und dem HDL-Cholesterin nachgewiesen.

Die negative Assoziation zwischen AW und HDL-Cholesterin, das als einzige Variable neben der Plasmaviskosität sowohl bei Männern als auch bei Frauen einen signifikanten Beitrag zur Erklärung der Varianz des AW lieferte, erwies sich in allen untersuchten Modellen als sehr stabil. Auch wenn die Plasmaviskosität mit einbezogen wurde, die mit dem AW zumin-

dest verwandt zu sein scheint, wurde die partielle Korrelation nur abgeschwächt, blieb aber hochsignifikant. Offensichtlich wird die Beziehung zwischen HDL-Cholesterin und AW zumindest zu einem Teil über einen eigenständigen Mechanismus vermittelt, der von den anderen Risikovariablen im Modell relativ unabhängig ist und von der Plasmaviskosität nur teilweise erfaßt wird.

Die Ursache der statistischen Assoziation zwischen HDL-Cholesterin und AW kann mit den vorliegenden Daten nicht geklärt werden. Es wäre immerhin möglich, daß die wichtige Rolle der HDL im Lipoproteinstoffwechsel nicht nur zu einer antiatherogenen Schutzfunktion für das Endothel, sondern auch zu einer Beeinflussung der Erythrozyten führt. Dabei könnte die Aktivität der Lecithin:Cholesterol-Acyltransferase (LCAT) [27] ein Bindeglied sein. Apolipoprotein A-I, das Hauptprotein der HDL, ist ein Aktivator dieses Enzyms [5,22,23,]. Das bei der Veresterung von Cholesterin freigesetzte Lysolecithin ist als Hemmstoff der Blutkörperchensenkung bekannt [1,82,83]. In der vorliegenden Arbeit wurde eine analoge Hemmung der Erythrozytenaggregation auch unter den Bedingungen der AW-Messung gefunden (vgl. Abschnitt 3.2.2.).

In der Literatur finden sich zu dieser Frage widersprüchliche Befunde. So wurde eine negative Korrelation zwischen HDL-Cholesterin und LCAT-Aktivität gefunden [69], was angesichts der vielfach beschriebenen Funktion des Apolipoprotein A-I, d.h. des Hauptproteins der High Density Lipoproteine, als LCAT-Aktivator [5,56] erstaunlich ist. Einige Auto-

ren postulierten eine kausale Rolle für das insbesondere bei Hyperlipidämien vermehrt freigesetzte Lysolecithin bei der Pathogenese der Atherosklerose [70,99]. Untersuchungen über Erythrozytenaggregation im Zusammenhang mit in vivo-Konzentrationen von Lysolecithin liegen offenbar nicht vor.

Eine zweite Möglichkeit für die Erklärung der Assoziation von AW und HDL-Cholesterin wäre, daß die gesteigerte Erythrozytenaggregation ein Sekundärphänomen bei atherosklerotischen Gefäßveränderungen ist und deshalb bei Personen mit niedrigem HDL-Cholesterin, bei denen die Gefäßschädigung im Mittel ausgeprägter ist, höher ist als bei Personen mit höheren HDL-Werten.

Mit den verfügbaren Befunden zum Mechanismus der Erythrozyten-Aggregation kann nicht zwischen diesen beiden (und denkbaren weiteren) Möglichkeiten entschieden werden (vgl. Abschnitt 4.1.3.).

4.1.3. AW und Atherosklerose

Solange weder der Mechanismus der gesteigerten Erythrozyten-Aggregation bei atherosklerotischen Erkrankungen noch die prognostische Bedeutung des AW geklärt sind, kann zwischen einer Reihe von grundsätzlichen Möglichkeiten in Bezug auf die Stellung des AW in der Pathogenese von Gefäßkrankheiten und ihrer Komplikationen nicht entschieden werden. Eine ungeklärte Grundfrage ist, ob die gesteigerte Erythrozytenaggregation ein Glied an irgendeiner Stelle der komple-

zen Kausalketten zwischen Risikofaktoren und Endothelschädigung bzw. zwischen bestehender Gefäßerkrankung und akuter Komplikation ist oder ob sie lediglich ein Epiphänomen ist, das zwar möglicherweise als Indikator eines kardiovaskulären Risikos geeignet ist, aber keine pathogenetische Bedeutung besitzt. Im ersten Fall wäre eine präventive oder therapeutische Intervention durch direkte Beeinflussung der Erythrozytenaggregation denkbar, im zweiten Fall immerhin eine Verbesserung der Früherkennung im latenten, präklinischen Stadium der Atherosklerose.

In den untersuchten multivariaten Modellen lag der Anteil der erklärten Varianz des AW zwischen etwa 30% (Modell 1 mit den drei Hauptrisikofaktoren und dem Alter) und etwa 60% (Modell 4 mit mehreren konventionellen Risikovariablen und der Plasmaviskosität). Dies bedeutet einerseits, daß ein nicht unerheblicher Teil der durch die AW-Bestimmung erhaltenen Information mit Hilfe konventioneller Variablen und verwandter hämorheologischer Parameter erhalten werden könnte; andererseits ist ein etwa gleich großer Teil nicht erklärt. Unter der Annahme, daß dieser unerklärte Teil der Varianz eine prognostisch oder diagnostisch relevante Information enthält, könnte durch eine kombinierte Bestimmung konventioneller Risikovariablen und des AW die individuelle Risikoabschätzung verbessert werden. Dazu muß in einer prospektiven Untersuchung die Wertigkeit des AW als Indikator eines kardiovaskulären Risikos im Vergleich zu konventionellen Bestimmungen und weiteren Methoden wie z.B. der Plasmaviskosität ermittelt werden.

Plasmaviskosität und Erythrozytenaggregation sind insofern eng verwandt, als beide Größen stark vom Gehalt des Plasmas an Fibrinogen und anderen makromolekularen Proteinen abhängen. Der Befund, daß in der multivariaten Analyse auch unter Berücksichtigung der Plasmaviskosität nicht mehr als etwa 60% der Varianz des AW erklärt werden konnten, könnte als Hinweis darauf gewertet werden, daß trotz der Verwandtschaft zwischen Plasmaviskosität und Erythrozytenaggregation bedeutende Unterschiede bestehen. Beispielsweise könnte eine qualitative Veränderung oder Heterogenität des Fibrinogens bei unveränderter Plasmaviskosität einen erhöhten oder erniedrigten AW zur Folge haben. Des weiteren ist eine Beeinflussung des AW durch niedermolekulare Inhibitoren wie Lysolecithin möglich, die vermutlich keinen Effekt auf die Plasmaviskosität haben. Inwieweit potentielle, nicht durch die Plasmaviskosität erfaßte Faktoren eine Bedeutung für die Beziehung zwischen AW und Atherosklerose besitzen, kann ohne weitere Untersuchungen nicht beurteilt werden. Falls es einen für atherosklerotische Erkrankungen relativ spezifischen Mechanismus der Erythrozyten-Aggregation gibt, könnte seine Aufklärung zur Entwicklung eines unter klinischen oder epidemiologischen Routinebedingungen einsetzbaren biochemischen Tests führen.

4.2. In vitro Versuche zum Mechanismus des AW

4.2.1. AW und Phosphorylierungsgrad des Fibrinogens

Humanes Fibrinogen besitzt in zwei seiner sechs Untereinheiten, den beiden $\alpha\kappa$ -Ketten, je 2 Stellen, an denen anorganisches Phosphat kovalent gebunden sein kann [88]. Eine Stelle befindet sich am Serin in Position 3 nahe dem N-terminalen Ende der $\alpha\kappa$ -Kette innerhalb des Fibrinopeptids A, das bei der Bildung von Fibrin aus Fibrinogen durch Thrombin abgespalten wird. Die zweite Bindungsstelle ist Serin in Position 345 der $\alpha\kappa$ -Kette [88].

Der Phosphorgehalt von Fibrinogen verteilt sich zu gleichen Teilen auf die beiden Bindungsstellen [88], so daß die Bestimmung des Phosphorylierungsgrades am Fibrinopeptid A ein Maß für den Phosphorylierungsgrad des Fibrinogens liefert.

Der Phosphorylierungsgrad (=Anteil des phosphorylierten Fibrinogens bzw. Fibrinopeptids A am gesamten Fibrinogen bzw. Fibrinopeptid A) scheint unter physiologischen Bedingungen relativ konstant zu sein. SEYDEWITZ und WITT fanden Werte von $23,6 \pm 3,6$ % bei gesunden Blutspendern und $22,0-24,5$ % in kommerziellen Fibrinogenpräparaten [89]. Fetales Fibrinogen hat einen etwa doppelt so hohen Phosphorgehalt bzw. Phosphorylierungsgrad als adultes Fibrinogen [89,104].

Während einer Akute-Phase-Reaktion, wie z.B. nach einem größeren chirurgischen Eingriff, steigt nicht nur die Fibrinogenkonzentration im Plasma, sondern auch der Phosphorylierungsgrad des Fibrinogens bis auf mehr als das Doppelte des Ausgangswertes an, wobei der Anstieg sehr rasch erfolgt und

das Maximum dem der Fibrinogen-Konzentration um einige Tage vorausgeht [89].

Eine mögliche, aber noch nicht bewiesene Erklärung für diesen Anstieg des Anteils des phosphorylierten Fibrinogens wäre, daß neusynthetisiertes Fibrinogen auch unter normalen Bedingungen vollständig phosphoryliert aus den Hepatozyten ausgeschleust wird und normalerweise ein ziemlich stabiles Gleichgewicht zwischen Neusynthese und Dephosphorylierung in der Zirkulation vorliegt. Der Anstieg des Phosphorylierungsgrades während der Akuten-Phase-Reaktion wäre dann allein durch die bekannte starke Steigerung der Fibrinogensynthese erklärbar [53].

Bisher wurde kein Nachweis für eine funktionelle Bedeutung der Phosphatgruppen am Fibrinogen erbracht. Zwar wurde eine leicht verlängerte Gerinnungszeit nach Dephosphorylierung in vitro beobachtet [7], jedoch konnte dieser Befund nicht bestätigt werden [104]. Wichtige Eigenschaften des Fibrinogens wie die Kinetik der Thrombin-induzierten Fibrinbildung scheinen demnach vom Phosphorgehalt unabhängig zu sein [104].

Ebenfalls unbekannt ist, inwieweit ein Zusammenhang besteht zwischen dem unter Akute-Phase-Bedingungen gesteigerten Anteil des phosphorylierten Fibrinogens und anderen hierbei beobachteten Veränderungen wie z.B. dem Anstieg der sogenannten "heparin precipitable fraction" (HPF) [31,32,34] oder der Zunahme von Fibrinogenfraktionen mit höherem Molekulargewicht (HMW-Fibrinogen) [31,35], die einen ganz ähnlichen, ebenfalls der Fibrinogenkonzentration vorauseilenden

Verlauf zeigen.

Nach den hier vorgelegten in vitro Versuchen, bei denen sich kein Unterschied im AW zwischen Proben mit gegenüber dem Kontrollplasma erhöhtem bzw. abgesenktem Anteil an phosphoryliertem Fibrinogen bei identischer Erhöhung der Fibrinogengesamtkonzentration fand, scheinen die Phosphatgruppen des Fibrinogens keinen Einfluß auf seine aggregierende Wirkung gegenüber Erythrozyten zu haben. Folgende Einschränkungen dieser Schlußfolgerung sind jedoch zu bedenken: Erstens konnte der Anteil an phosphoryliertem Fibrinogen in den Proben nicht gemessen, sondern nur aufgrund von - allerdings begründeten - Annahmen abgeschätzt werden. Es ist nicht ganz auszuschließen, daß der Unterschied zwischen den Proben geringer war als geschätzt. Zweitens wurden, auch wenn die Schätzung zutrifft, bei weitem nicht die bei einer Akute-Phase-Reaktion beobachteten Spitzenwerte erreicht. Drittens konnte aufgrund des begrenzten Materials keine größere Versuchsreihe durchgeführt werden. Schließlich besteht grundsätzlich die Möglichkeit, daß ein dem gesuchten Effekt gegenläufiger Effekt interferierte. Nach einem der von SEYDEWITZ und WITT vorgeschlagenen kinetischen Modelle [89], in dem von einer vollständigen Phosphorylierung des Fibrinogens zum Zeitpunkt der Sekretion aus den Hepatozyten und einer allmählichen Dephosphorylierung in der Zirkulation ausgegangen wird, müßte das dephosphorylierte Fibrinogen im Durchschnitt "älter" sein als das phosphorylierte Fibrinogen. Dies könnte bedeuten, daß auch andere Abbauprozesse beim dephosphorylierten Fibrinogen im Mittel ausgeprägter

sind als beim phosphorylierten Fibrinogen. Als Beispiel sei die Degradation von Fibrinogen mit hohem Molekulargewicht (HMW-Fibrinogen) zu Fibrinogen mit niedrigem Molekulargewicht (LMW-Fibrinogen) [33] genannt. Eine Übersicht über die beim Fibrinogen nachgewiesenen molekularen Heterogenitäten gibt MOSESSON [64].

Die für die hier vorgelegten Versuche verwendeten Präparationen mit hohem und niedrigem Anteil an phosphoryliertem Fibrinogen wurden aus kommerziellem Fibrinogen (Fa. Kabi) mittels Ionenaustausch-Chromatographie gewonnen (SEYDEWITZ, persönliche Mitteilung). Es ist zumindest denkbar, daß hierbei neben den Phosphatresten auch andere molekulare Heterogenitäten des Fibrinogens als Trennungskriterien wirksam sind, so daß sich Fraktionen mit unterschiedlichem Phosphorylierungsgrad auch hinsichtlich weiterer Parameter unterscheiden könnten.

Zusammenfassend ist vorläufig davon auszugehen, daß die Phosphatgruppen am Fibrinogen dessen aggregationsfördernde Eigenschaften nicht beeinflussen. Zur Sicherung dieser Hypothese sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig, z.B. mit Fibrinogen von einem einzigen Spender und in vitro-Dephosphorylierung, evtl. nach vorheriger Fraktionierung hinsichtlich weiterer molekularer Heterogenitätskriterien (z.B. Molekulargewicht).

4.2.2. AW nach Inkubation von Plasma bzw. Zugabe von Lysolecithin

Die Ergebnisse zeigen klar, daß die bei der Blutkörperchen-senkung schon seit langem bekannten Mechanismen einer in vitro-Hemmung der Erythrozytenaggregation auch unter den Bedingungen der AW-Messung wirksam sind. FAHRAEUS [20] und BERGENHEM [6] beschrieben in ihren grundlegenden Arbeiten u.a. den sogenannten "Wärmestabilisierungsprozeß" des Blutes, der darin besteht, daß Plasma eines beschleunigt senkenden Blutes nach mehrstündiger Inkubation bei Körpertemperatur seine senkenden, d.h. erythrozytenaggregierenden Eigenschaften verliert. Die schon von ihnen geäußerte Vermutung, daß es sich wahrscheinlich um einen enzymatischen Prozeß handle, bei dem ein Inhibitor der Erythrozytenaggregation entstehe, konnte später u.a. durch Untersuchungen der Arbeitsgruppe um RUHENSTROTH-BAUER bewiesen werden. Verantwortlich ist die Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (E.C. 2.3.1.43.) des Plasmas, die eine wichtige Stellung im Stoffwechsel der Plasmalipide und -lipoproteine einnimmt [1,5,81,82,83,86]. Bei der durch dieses Enzym katalysierten Veresterung von freiem Cholesterol mit einer von Lecithin stammenden Fettsäure entsteht Lysolecithin, welches an die Membran der Erythrozyten bindet und deren Aggregationsfähigkeit herabsetzt. Inwieweit der unterschiedlich steile Abfall des AW mit der Zeit auf unterschiedliche Aktivitäten der LCAT und die unterschiedliche Wirkung der Zugabe von kleinen Mengen an Lysolecithin zu den Proben auf präexistente Unterschiede der Lysolecithinkonzentration im unbehandelten Plas-

ma zurückzuführen waren, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht werden. Beide untersuchten Probanden befanden sich in der Akuten Phase nach einem Herzinfarkt, einer Situation, bei der eine Verminderung der LCAT-Aktivität im Plasma beobachtet wurde [74].

Als praktische Konsequenz ergibt sich aus diesen Befunden die Notwendigkeit, längerdauernde Inkubation von Proben, in denen der AW gemessen werden soll, zu vermeiden. Bei Raumtemperatur läuft der Prozeß offenbar sehr langsam ab. Ob der von PORZ beschriebene Abfall des AW mit zunehmendem Zeitabstand zur Blutentnahme auf denselben Prozeß zurückgeht, ist unklar.

Bei der Neuraminidase-Behandlung von Plasma wurde entsprechend diesen Befunden nicht beim Temperaturoptimum des Enzyms von 37⁰ C, sondern bei Raumtemperatur inkubiert.

4.2.3. AW nach Neuraminidase-Behandlung von Plasma

STICKL [92] führte Versuche durch, bei denen sich nach Behandlung von Serum mit Neuraminidase eine deutliche Abschwächung der senkungsbeschleunigenden Eigenschaften des Serums zeigte. Diese Befunde lassen eine funktionelle Bedeutung der endständigen Neuraminsäuren der Glykoproteine des Serums bzw. Plasmas bei der Erythrozyten-Aggregation vermuten.

Da möglicherweise auch die gesteigerte Aggregationstendenz bei atherosklerotischen Prozessen von Glykoproteinen verursacht wird, sollte die Rolle der Neuraminsäuren im Hinblick

auf die AW-Messung neu untersucht werden.

Wegen erheblicher methodischer Probleme (vgl. Abschnitt 2.3.3.) liegen zu dieser Frage nur wenige auswertbare Versuche vor. Die Ergebnisse sind zudem widersprüchlich. Zwar wurde nach Neuraminidase-Behandlung von Plasma eine leichte Absenkung des AW gegenüber einer bei Raumtemperatur aufbewahrten Kontrollprobe gefunden, der direkte Vergleich mit einer Probe, die einer identischen Prozedur unterworfen wurde (Inkubation, Rotation, Zugabe von Agarose-Körnchen, mit dem einzigen Unterschied, daß keine Neuraminidase vorhanden war), zeigte jedoch keinen Unterschied, so daß auch ein unspezifischer (Adsorptions-?) Prozess als Ursache in Frage kommt.

Aufgrund der vorliegenden Daten kann keine Aussage über die Bedeutung der endständigen Neuraminsäuren der Plasmaproteine für die Erythrozytenaggregation gemacht werden. In der neueren Literatur finden sich keine entsprechenden Arbeiten, obwohl z.B. desialyliertes Fibrinogen unter anderen Fragestellungen eingehend untersucht worden ist. Die Funktionen des Fibrinogens bei Gerinnung und Thrombozytenaggregation bzw. -adhäsion scheinen durch Entfernung der Neuraminsäurereste nicht beeinträchtigt zu werden [17,29,58,].

4.2.4. Versuche mit Thrombozyten

Thrombospondin, ein in den α -Granula der Thrombozyten gespeichertes und bei der Thrombozytenaktivierung freigesetztes Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 450000 D, dem eine entscheidende Rolle bei der Thrombozytenaggregation zukommt [25,26,55,] und das nach in vitro-Befunden auch von Monozyten und Makrophagen [36] sowie von Fibroblasten [37] und Endothelzellen [65] synthetisiert wird, vermag nach GARTNER [25,26] in vitro Erythrozyten zu agglutinieren. Bei den hier vorgelegten Versuchen mit Überständen von chemisch aktivierten oder mechanisch zerstörten Thrombozyten fand sich dagegen keine gesteigerte Aggregation.

Unter der Annahme, daß überhaupt eine Freisetzung von Thrombozytenproteinen stattfand (ein Nachweis war nicht möglich), könnte eine Reihe von methodischen Problemen für diese Diskrepanz verantwortlich sein. So berichten GARTNER und Mitarbeiter in einer Arbeit, die mir zum Zeitpunkt der hier besprochenen Versuche noch nicht bekannt war, daß die Agglutination nur in Anwesenheit von Ca-Ionen stattfindet [24]. Die Autoren erklären dies dadurch, daß es nur unter Mitwirkung von Ca-Ionen zur Bildung von polyvalenten Thrombospondin-Aggregaten kommt, die für die agglutinierende Eigenschaft einer Thrombospondin-Präparation verantwortlich sind. Bei den vorgelegten Versuchen enthielten aber sowohl das Plasma als auch der Puffer EDTA, so daß das Fehlen von freien Ca-Ionen einen aggregierenden Effekt verhindert haben könnte. Außerdem wurden für die Agglutinationsversuche von GARTNER Trypsin-behandelte Erythrozyten verwendet, bei denen zusam-

men mit den abgespaltenen Oberflächenproteinen der Zellmembran sicher auch ein großer Teil der Neuraminsäuren und damit der negativen elektrischen Ladungen entfernt wurde. Diese Zellen sind aufgrund der verminderten Abstoßungskräfte vermutlich wesentlich leichter aggregierbar als native Erythrozyten [13,38,57].

Es ist deshalb zum gegenwärtigen Zeitpunkt unklar, ob die beschriebene in vitro-Agglutination von Erythrozyten durch Thrombospondin mit der ex vivo-Aggregation, die bei der AW-Messung erfaßt wird, etwas zu tun hat. Gegen diese Hypothese spricht, daß Hemmstoffe der Thrombospondin-vermittelten Agglutination wie basische Aminosäuren (L-Lysin) oder Hexosamine (Glucosamin, Galactosamin) [25,26] bei Zugabe zum Plasma den AW nicht zu senken scheinen. In einigen Versuchen zeigte sich sogar eine AW-steigernde Wirkung. Der AW-Anstieg in Anwesenheit von L-Lysin könnte durch Lysinpolymere verursacht worden sein, deren starke aggregationsfördernde Wirkung bekannt ist [47]. Weshalb Galactosamin eine Zunahme des AW bewirkte, ist unklar.

Gegen eine unmittelbare Wirkung von Thrombospondin bei der durch den AW erfaßten Erythrozytenaggregation spricht auch, daß die Konzentration von Thrombospondin im Normalfall in Plasma mit 20-300 ng/ml bzw. 0,04-0,67 nmol/l sehr niedrig ist, in Serum dagegen infolge massiver Freisetzung von Thrombospondin während des Gerinnungsprozesses um den Faktor 100 höher liegt (10000-30000 ng/ml bzw. 2-67 nmol/l) [78]. Ob die bei atherosklerotischen Erkrankungen gefundene verkürzte Lebensdauer der Thrombozyten [73] zu einer erhöhten

Konzentration von Thrombospondin im Plasma führt, scheint noch nicht untersucht worden zu sein. Ebenfalls unklar ist, ob die Endothelzellen atherosklerotisch veränderter Gefäße vermehrt Thrombospondin synthetisieren und freisetzen.

Die Serum- bzw. Plasmakonzentrationen von Thrombospondin verhalten sich somit umgekehrt wie die des Fibrinogens, das im Plasma in einer um den Faktor 10000 höheren molaren Konzentration vorhanden ist als Thrombospondin, im Serum jedoch fehlt. Der AW ist jedoch stets in Plasma wesentlich höher als in Serum. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz wäre, daß Thrombospondin nur als Kofaktor von Fibrinogen wirkt, alleine jedoch nicht oder wesentlich schwächer. Ein derartiges Zusammenwirken von Thrombospondin und Fibrinogen scheint ein sehr wichtiger Schritt bei der Thrombozytenaggregation zu sein [55]. Die Fähigkeit dieser beiden makromolekularen Proteine, miteinander Komplexe zu bilden [54], könnte analog dazu auch zu einer vermehrten Erythrozytenaggregation beitragen. Andererseits ist die Komplexbildung zwischen Thrombospondin und Fibrinogen ebenso wie die oben besprochene Thrombospondin-vermittelte in vitro-Agglutination Trypsin-behandelter, fixierter Erythrozyten durch Hexosamine und basische Aminosäuren hemmbar, was für den AW nach den hier vorgelegten Ergebnissen zumindest unwahrscheinlich ist.

Die interessante Frage, ob ein funktioneller Zusammenhang zwischen Thrombozyten-Aggregation und Erythrozyten-Aggregation besteht, ist demnach offen und erfordert weitere Untersuchungen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

- Bei einer Teilstichprobe einer epidemiologischen Herz-Kreislauf-Studie (MONICA-Projekt Augsburg) fand sich eine Zunahme des mittleren AW mit zunehmendem Alter. In allen Altersgruppen war der mittlere AW bei Männern höher als bei Frauen.
- Die in früheren klinischen Studien gefundene Erhöhung des mittleren AW bei Probanden mit einem oder mehreren Risikofaktoren im Vergleich zu Probanden ohne Risikofaktoren konnte an diesem nicht selektierten Kollektiv bestätigt werden.
- In einer multiplen Korrelationsanalyse zeigte sich eine signifikante negative Korrelation zwischen dem AW und der Konzentration des High Density Lipoprotein-Cholesterins (HDL-Cholesterins) im Serum. Diese negative Assoziation war auch bei Berücksichtigung mehrerer weiterer Variablen in der multivariaten Analyse sehr stabil, während die Beziehungen zwischen dem AW und anderen Variablen teilweise durch gemeinsame Prädiktoren (wie z.B. das Alter) vermittelt zu sein scheinen.
- In der multivariaten Analyse konnten nur etwa 40% der Varianz des AW durch konventionelle Risikofaktoren (Alter, Blutdruck, Gesamtcholesterin im Serum, HDL-Cholesterin im Serum, Harnsäure im Serum, Übergewichtsindex,

Zigarettenkonsum, Alkoholkonsum) erklärt werden. Durch Hinzunahme mit dem AW vermutlich enger verwandter Variablen wie der Proteinkonzentration im Serum oder der Plasmaviskosität erhöhte sich der Anteil der erklärten Varianz auf etwa 50% bzw. 60%. Möglicherweise ist dies Ausdruck einer spezifischeren Reaktion des AW auf Veränderungen des Plasmaproteinprofils.

- In Versuchen mit Fibrinogenproben mit hohem bzw. niedrigem Phosphorylierungsgrad am Fibrinopeptid A fand sich kein Einfluß des Phosphorylierungsgrades auf den AW. Es konnte gezeigt werden, daß der AW in vitro nach Inkubation von Plasma bei Körpertemperatur oder Zugabe von Lysolecithin absinkt.
- Bei einem wichtigen Arbeitsschritt, bei dem die Suspension mit den in vitro gebildeten Erythrozytenaggregaten zur Volumenmessung in eine Pipettenspitze aufgenommen wird, wurde die Pipettiergeschwindigkeit als mögliche untersucherabhängige Fehlerquelle nachgewiesen und der Schritt daraufhin automatisiert.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. ADLKOFER, F., W.SCHIEBEL, E.ANCKER, G.RUHENSTROTH-BAUER:
Nachweis, Anreicherung und Charakterisierung eines
Lysolecithin freisetzenden Enzyms aus menschlichem Serum.
Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie 349:
417-428 (1968).
2. AMINOFF, D.:
Methods for the quantitative estimation of
N-acetylneuraminic acid and their application to
hydrolysates of sialomucoids.
Biochemical Journal 81: 384-392 (1961).
3. ASSMANN, G., W.OBERWITTLER, H.SCHULTE, H.SCHRIEWER,
H.FUNKE, P.H.EPPING, W.H.HAUSS:
Prädiktion und Früherkennung der koronaren Herzkrankheit.
Prospektive epidemiologische Studie bei
Betriebsangehörigen im Raum Westfalen.
Internist 21: 446-459 (1980).
4. ASSMANN, G., H.SCHULTE:
HDL-Cholesterin, HDL-Apolipoprotein A-I und
kardiovaskuläre Risikofaktoren.
In: LADWIG, K.-H. (Hrsg.):
Herz-Kreislauf-Prävention. Methodische Probleme,
Risikofaktoren und Früherkennung. Ein Werkstattbericht.
München-Wien-Baltimore, Urban & Schwarzenberg, 1984.
p. 57-78.
5. ASSMANN, G.:
Lipidstoffwechsel und Atherosklerose.
Stuttgart, Schattauer Verlag, 1982.

6. BERGENHEM, B.:
Experimentelle Untersuchungen über die spontanen
Veränderungen des Blutes in vitro hinsichtlich
Suspensionsstabilität, Komplementaktivität und
Antithrombinfunktion.
Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica
Supplementum 34: 1-251 (1939).

7. BLOMBÄCK, B., M.BLOMBÄCK, J.SEARLE:
On the occurrence of phosphorus in fibrinogen.
Biochimica et Biophysica Acta 74: 148-151 (1963).

8. BOSS, N., H.WIETELMANN, M.BIERNER, W.RUDOLPH,
M.SCHLEPPER, S.KOENIG-ERICH, G.RUHENSTROTH-BAUER:
Red blood cell aggregation in men with coronary heart
disease.
European Journal of Cardiology 12: 47-54 (1980).

9. BOSS, N., P.PORZ, G.RUHENSTROTH-BAUER, K.-H.LADWIG:
Die Beziehung zwischen dem Erythrozytenaggregationswert
(AW) und Herzinfarkt-Risikofaktoren.
In: EHRLY, A.M. (Hrsg.):
Klinische Hämorheologie: Eine Bestandsaufnahme
München-Bern-Wien, W. Zuckschwerdt-Verlag, , 1983.
p. 110-114.

10. BOSS, N., S.KOENIG, G.RUHENSTROTH-BAUER:
Die Erythrocytenaggregation bei Menschen mit
Risikofaktoren eines Herzinfarkts.
Klinische Wochenschrift 53: 385-389 (1975).

11. BOSS, N., H.CHMIEL, V.KACHEL, G.RUHENSTROTH-BAUER:
Erythrozytenaggregation bei Nichtrauchern, Rauchern und
Herzinfarktpatienten.
Blut 27: 191-195 (1973).

12. CHIEN, S., S.USAMI, R.J.DELLENBACK, M.I.GREGERSEN:
Blood viscosity: influence of erythrocyte deformation.
Science 157: 827-829 (1967).
13. CHIEN, S., G.W.COOPER, K.-M.JAN, L.H.MILLER, C.HOWE,
S.USAMI, P.LALEZARI:
N-Acetylneuraminic acid deficiency in erythrocyte
membranes: biophysical and biochemical correlates.
Blood 43: 445-460 (1974).
14. CHIEN, S., K.-M.JAN:
Ultrastructural basis of the mechanism of rouleaux
formation.
Microvascular Research 5: 155-166 (1973).
15. CHIEN, S., S.USAMI, R.J.DELLENBACK, M.I.GREGERSEN:
Blood viscosity: influence of erythrocyte aggregation.
Science 157: 829-831 (1967).
16. CHIEN, S.:
Electrochemical and ultrastructural aspects of red cell
aggregation.
Bibliotheca anatomica 11: 244-250 (1973).
17. COLLIER, B.S.:
Asialofibrinogen supports platelet aggregation and
adhesion to glass.
Blood 53: 325-332 (1979).
18. COULTER, W.H.:
Means for counting particles suspended in a fluid.
U.S. Patent Nr. 2656508 (1953).
19. ERNST, E.:
Erythrozytenaggregation statt BKS ?
LaborPraxis in der Medizin, April 1984.

20. FAHRAEUS, R.:
The suspension-stability of blood.
Acta Medica Scandinavica 55: 1 (1921).
21. FAHRAEUS, R.:
The influence of the rouleau formation of the
erythrocytes on the rheology of the blood.
Acta Medica Scandinavica 161: 151-165 (1958).
22. FIELDING, C.J., V.G.SHORE, P.E.FIELDING:
A protein cofactor of lecithin:cholesterol
acyltransferase.
Biochemical and Biophysical Research Communications 46:
1493-1498 (1972).
23. FIELDING, C.J.:
Mechanisms of action of lecithin:cholesterol acyl-
transferase.
Methods in Enzymology 129: 783-790 (1986).
24. GARTNER, T.K., M.E.DOCKTER:
Secreted platelet thrombospondin binds monovalently to
platelets and erythrocytes in the absence of free Ca^{2+} .
Thrombosis Research 33: 19-30 (1983).
25. GARTNER, T.K., J.M.GERRARD, J.G.WHITE, D.C.WILLIAMS:
The endogenous lectin of human platelets is an α -granule
component.
Blood 58: 153-157 (1981).
26. GARTNER, T.K., D.C.WILLIAMS, F.C.MINION, D.R.PHILLIPS:
Thrombin induced platelet aggregation is mediated by a
plasma membrane-bound lectin.
Science 200: 1281-1283 (1978).

27. GLOMSET, J.A.:
The plasma lecithin:cholesterol acyltransferase reaction.
Journal of Lipid Research 9: 155-167 (1968).
28. GORDON, T., W.P.CASTELLI, M.C.HJORTLAND, W.B.KANNEL,
T.R.DAWBER:
High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease.
American Journal of Medicine 62: 707-714 (1977).
29. HARFENIST, E.J., M.A.PACKHAM, J.F.MUSTARD:
Identical behavior of fibrinogen and asialo-fibrinogen in reactions with platelets during ADP-induced aggregation.
Thrombosis Research 20: 353-358 (1980).
30. HEISS, G., N.J.JOHNSON, S.REILAND, C.E.DAVIS,
H.A.TYROLER:
The epidemiology of plasma high-density lipoprotein cholesterol levels. The lipid research clinics program prevalence study.
Circulation 62 (suppl. IV): 116-136 (1980).
31. HOLM, B., F.BROSSTAD, P.KIERULF, H.C.GODAL:
Polymerization properties of two normally circulating fibrinogens, HMW and LMW. Evidence that the COOH-terminal end of the α -chain is of importance for fibrin polymerization.
Thrombosis Research 39: 595-606 (1985).
32. HOLM, B., H.C.GODAL:
Evidence that changes in fibrinogen quality during acute phase reactions are of major importance for the amount of heparin precipitable fraction (HPF).
Thrombosis Research 39: 449-458 (1985).

33. HOLM, B., D.W.T.NILSEN, H.C.GODAL:
Evidence that low molecular fibrinogen (LMW) is formed
in man by degradation of high molecular weight
fibrinogen (HMW).
Thrombosis Research 41: 879-884 (1986).
34. HOLM, B., H.C.GODAL, P.KIERULF:
Does qualitatively altered fibrinogen contribute to the
increased heparin precipitable fraction (HPF) in acute
myocardial infarction (AMI) ?.
Thrombosis Research 33: 9-18 (1983).
35. HOLM, B., H.C.GODAL:
Quantitation of three normally occurring plasma
fibrinogens in health and during socalled "acute phase"
by SDS electrophoresis of fibrin obtained from
EDTA-plasma.
Thrombosis Research 35: 279-290 (1984).
36. JAFFE, E.A., J.T.RUGGIERO, D.J.FALCONE:
Monocytes and macrophages synthesize and secrete
thrombospondin.
Blood 65: 79-84 (1985).
37. JAFFE, E.A., J.T.RUGGIERO, L.L.K.LEUNG, M.J.DOYLE,
P.J.McKEOWN-LONGO, D.F.MOSHER:
Cultured human fibroblasts synthesize and secrete
thrombospondin and incorporate it into extracellular
matrix.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the
USA 80: 998-1002 (1983).
38. JAN, K.-M., S.CHIEN:
Role of surface electric charge in red blood cell
interactions.
Journal of General Physiology 61: 638-654 (1973).

39. KACHEL, V., H.METZGER, G.RUHENSTROTH-BAUER:
Der Einfluß der Partikeldurchtrittsbahn auf die
Volumenverteilungskurven nach dem Coulter-Verfahren.
Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin 153:
331-347 (1970).
40. KACHEL, V., H.SCHNEIDER, K.SCHEDLER:
A new flow cytometric pulse height analyzer offering
microprocessor controlled data acquisition and
statistical analysis.
Cytometry 1: 175 (1980).
41. KACHEL, V.:
Sizing of cells by electrical resistance pulse
technique. Methodology and application in cytometric
systems.
In: CATSIMPOOLAS, N. (ed.):
Cell analysis.
New York - London, Plenum Press, 2. ed., 1982.
p. 195-331.
42. KACHEL, V.:
Methodik und Ergebnisse optischer Formfaktor-
untersuchungen bei der Zellvolumenmessung nach Coulter.
Microscopica Acta 75: 419-428 (1974).
43. KACHEL, V.:
Methoden zur Analyse und Korrektur apparativ bedingter
Meßfehler beim elektronischen Verfahren zur
Teilchengrößenbestimmung nach Coulter.
Dissertation, Technische Universität Berlin, 1972.
44. KACHEL, V.:
Basic principles of electrical sizing of cells and
particles and their realization in the new instrument
"Metricell".
Journal of Histochemistry and Cytochemistry 24: 211-230
(1976).

45. KACHEL, V.:
Electrical resistance pulse sizing (Coulter sizing).
In: MELAMED, M., P.MULLANEY, M.MENDELSON (eds.):
Flow cytometry and sorting.
New York, J. Wiley & Sons, 1979.
p. 61-104.

46. KANNEL, W.B., W.P.CASTELLI, T.GORDON:
Cholesterol in the prediction of atherosclerotic
disease. New perspectives based on the Framingham study.
Annals of Internal Medicine 90: 85-91 (1979).

47. KATCHALSKY, A., D.DANON, A.NEVO, A.DE VRIES:
Interaction of basic polyelectrolytes with the red blood
cell. II. Agglutination of red blood cells by polymeric
bases.
Biochimica et Biophysica Acta 33: 120-138 (1959).

48. KEIL, U., V.CAIRNS, A.DÖRING, U.HÄRTEL, J.JORCIK,
S.PERZ, J.STIEBER:
MONICA-Projekt Region Augsburg. Herz-Kreislauf-Studie
der Weltgesundheitsorganisation (WHO). Manual of
Operations. Survey.
München, Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung,
1985.

49. KEIL, U., W.KOENIG, H.LÖWEL, V.CAIRNS, J.JORCIK,
A.HÖRMANN, G.HEISS, C.SCHOMANN:
MONICA-Projekt Region Augsburg. Herz-Kreislauf Studie
der Weltgesundheitsorganisation (WHO). Manual of
Operations. Myocardial Infarction Register.
München, Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung,
1985.

50. KEIL, U.:
Monica-Projekt. Herz-Kreislauf-Studie der Weltgesund-
heitsorganisation.
Herz-Kreislauf 2: 99-100 (1985).

51. KIESEWETTER, H., H.RADTKE, R.SCHNEIDER, K.MUSSLER,
A.SCHEFFLER, H.SCHMID-SCHÖNBEIN:
Das Mini-Erythrozyten-Aggregometer: Ein neues Gerät zur
schnellen Quantifizierung des Ausmaßes der Erythrozyten-
aggregation.
Biomedizinische Technik 27: 209-213 (1982).
52. KLOSE, H.J., E.VOLGER, H.BRECHTELSBAUER, L.HEINICH,
H.SCHMID-SCHÖNBEIN:
Microrheology and light transmission of blood. I. The
photometric effects of red cell aggregation and red cell
orientation.
Pflügers Archiv 333: 126-139 (1972).
53. KOJ, A.:
The measurement of absolute and relative synthesis rates
of fibrinogen.
Biochimica et Biophysica Acta 165: 97-107 (1968).
54. LEUNG, L.L.K., R.L.NACHMAN:
Complex formation of platelet thrombospondin with
fibrinogen.
Journal of Clinical Investigation 70: 542-549 (1982).
55. LEUNG, L.L.K.:
Role of thrombospondin in platelet aggregation.
Journal of Clinical Investigation 74: 1764-1772 (1984).
56. LEVY, R.I., B.M.RIFKIND:
The structure, function and metabolism of high-density
lipoproteins: a status report.
Circulation 62 (suppl. IV): 4-8 (1980).
57. MAEDA, N., K.IMAIZUMI, M.SEKIYA, T.SHIGA:
Rheological characteristics of desialylated erythrocytes
in relation to fibrinogen-induced aggregation.
Biochimica et Biophysica Acta 776: 151-158 (1984).

58. MARTINEZ, J., J.PALASCAK, C.PETERS:
Functional and metabolic properties of human
asialofibrinogen.
Journal of Laboratory and Clinical Medicine 89: 367-377
(1977).
59. MEISELMAN, H.J.:
Measures of blood rheology and erythrocyte mechanics.
In: COKELET, G.R., H.J.MEISELMAN, D.E.BROOKS (eds.):
Erythrocyte mechanics and blood flow.
New York, Alan R. Liss, 1980.
p. 75-117.
60. METZGER, H., V.KACHEL, G.RUHENSTROTH-BAUER:
Einfluß von Partikelgröße, -form und -konsistenz auf
rechtsschiefe Coulter-Volumenverteilungskurven.
Blut 23: 143-154 (1971).
61. MILLER, G.J., N.E.MILLER:
Plasma-high-density-lipoprotein concentration and
development of ischaemic heart-disease.
Lancet I: 16-19 (1975).
62. MILLER, N.E., O.H.FORDE, D.S.THELLE, O.D.MJOS:
The Tromso Heart-Study. High-density lipoprotein and
coronary heart-disease: a prospective case-control
study.
Lancet I: 965-968 (1977).
63. MILLER, N.E.:
The evidence for the antiatherogenicity of high density
lipoprotein in man.
Lipids 13: 914-919 (1978).
64. MOSESSON, M.W.:
Fibrinogen heterogeneity.
Annals of the New York Academy of Sciences 408: 97-113
(1983).

65. MOSHER, D.F., M.J.DOYLE, E.A.JAFFE:
Synthesis and secretion of thrombospondin by cultured human endothelial cells.
Journal of Cell Biology 93: 343-348 (1982).
66. NORDT, F.J., N.BOSS, D.KORNDORFER, G.RUHENSTROTH-BAUER:
Flow cytometric quantitation of erythrocyte aggregation: foundation for a diagnostic test for coronary artery disease.
Clinical Hemorheology 4: 445-454 (1984).
67. OTTL, J.:
Untersuchungen zur Funktion und zum Mechanismus des Erythrozytenaggregationswertes.
Dissertation, Universität München, 1984.
68. PFAFFEROTT, C., E.VOLGER:
Bedeutung der Fließeigenschaften des Blutes für die Mikrozirkulation.
Deutsche Medizinische Wochenschrift 108: 1845-1851 (1983).
69. PINON, J.-C., A.-M.BRIDOUX, M.-H.LAUDAT:
Initial rate of cholesterol esterification associated with high density lipoproteins in human plasma.
Journal of Lipid Research 21: 406-414 (1980).
70. PORTMAN, O.W., P.SOLTYS, M.ALEXANDER, T.OSUGA:
Metabolism of lysolecithin in vivo: effects of hyperlipemia and atherosclerosis in squirrel monkeys.
Journal of Lipid Research 11: 596-604 (1970).
71. PORZ, P., G.RUHENSTROTH-BAUER:
Klinische Prüfung des Erythrozytenaggregationswertes als Früherkennungsmaßnahme für die koronare Herzerkrankung und für periphere arterielle Verschlusskrankheiten.
München, Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung (GSF), 1984.

72. PORZ, P.:
Klinische Prüfung des Erythrozytenaggregationswertes (AW) zur Früherkennung der koronaren Herzkrankheit. Dissertation, Universität München, 1982.
73. RITCHIE, J.L., L.A.HARKER:
Platelet and fibrinogen survival in coronary atherosclerosis. Response to medical and surgical therapy.
American Journal of Cardiology 39: 595-598 (1977).
74. RITLAND, S., J.P.BLOMHOFF, S.C.ENGEL, S.SKREDE, E.GJONE:
The esterification of cholesterol in plasma after acute myocardial infarction.
Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation 35: 181-187 (1975).
75. RUHENSTROTH-BAUER, G., P.PORZ, N.BOSS:
Die medizinische Bedeutung des Erythrozytenaggregationswertes (AW).
In: LADWIG, K.-H. (Hrsg.): Herz-Kreislauf-Prävention. Methodische Probleme, Risikofaktoren und Früherkennung. Ein Werkstattbericht. München-Wien-Baltimore, Urban & Schwarzenberg, 1984. p. 119-127.
76. RUHENSTROTH-BAUER, G., P.PORZ, N.BOSS, S.KOENIG-ERICH, W.LEHMACHER, D.STAMM:
Der Erythrozyten-Aggregationswert als Maß von Herzinfarkt-Risikofaktoren und von Gefäßschäden.
Münchener Medizinische Wochenschrift 125: 771-774 (1983).
77. SACHS, L.:
Angewandte Statistik.
Berlin, Springer, 1978.

78. SAGLIO, S.D., H.S.SLAYTER:
Use of radioimmunoassay to quantify thrombospondin.
Blood 59: 162-166 (1982).
79. SCHAUER, R., A.P.CORFIELD, M.WEMBER, D.DANON:
A micro-method for quantitative determination of
acylneuraminic acids from erythrocyte membrane.
Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie
356: 1727-1732 (1975).
80. SCHAUER, R.:
Characterization of sialic acids.
Methods in Enzymology 50: 64-89 (1978).
81. SCHERER, R.:
Lecithinabbau und Cholesterinveresterung im Humanserum.
Neuere Erkenntnisse über die Stellung der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase im Fettstoffwechsel unter normalen und pathologischen Bedingungen.
Klinische Wochenschrift 52: 203-207 (1974).
82. SCHERER, R., G.RUHENSTROTH-BAUER:
Der Mechanismus der Blutkörperchensenkung. XVII. Über den Zusammenhang und die diagnostische Bedeutung der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase-Aktivität im Humanserum und der Wärmeinaktivierung der Blutkörperchensenkung.
Klinische Wochenschrift 52: 208-215 (1974).
83. SCHIEBEL, W., G.RUHENSTROTH-BAUER:
Der Mechanismus der Blutkörperchensenkung. XIII. Charakterisierung von Lysolecithin als Inhibitor der beschleunigten Blutkörperchensenkung im inkubierten Serum.
Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie
348: 27-36 (1967).

84. SCHMID-SCHÖNBEIN, H., G.GALLASCH, J.GOSEN von, E.VOLGER, H.J.KLOSE:
Red cell aggregation in blood flow. II. Effect on apparent viscosity of blood.
Klinische Wochenschrift 54: 159-167 (1976).
85. SCHMID-SCHÖNBEIN, H., G.GALLASCH, J.GOSEN von, E.VOLGER, H.J.KLOSE:
Red cell aggregation in blood flow. I. New methods of quantification.
Klinische Wochenschrift 54: 149-157 (1976).
86. SCHMITZ, G., G.ASSMANN, B.MELNIK:
The role of lecithin:cholesterol acyltransferase in high density lipoprotein₃/high density lipoprotein₂ interconversion.
Clinica Chimica Acta 119: 225-236 (1981).
87. SEDMAK, J.J., S.E.GROSSBERG:
Virus yield-reduction assays for interferon with the influenza virus neuraminidase assay.
Methods of Enzymology 70:369-373 (1981).
88. SEYDEWITZ, H.H., C.KAISER, H.ROTHWEILER, I.WITT:
The location of a second in vivo phosphorylation site in the A α -chain of human fibrinogen.
Thrombosis Research 33: 487-498 (1984).
89. SEYDEWITZ, H.H., I.WITT:
Increased phosphorylation of human fibrinopeptide A under acute phase conditions.
Thrombosis Research 40: 29-39 (1985).
90. SHIGA, T., K.IMAIZUMI, N.HARADA, M.SEKIYA:
Kinetics of rouleaux formation using TV image analyzer. I. Human erythrocytes.
American Journal of Physiology 245: 252-H258 (1983).

91. SIMONS, L.A.:
Interrelations of lipids and lipoproteins with coronary artery disease mortality in 19 countries.
American Journal of Cardiology 57: 5G-10G (1986).
92. STICKL, H., H.BÖcker:
Über die Beziehungen zwischen dem Neuraminsäuregehalt des Serums und der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit.
Klinische Wochenschrift 37: 636-638 (1959).
93. STOLTZ, J.F., F.PAULUS, P.DIXNEUF:
Kinetics of red blood cell aggregates and rouleaux formation.
Thrombosis and Haemostasis 54: 24-24 (1985).
94. THOM, R., A.HAMPE, G.SAUERBREY:
Die elektronische Volumenbestimmung von Blutkörperchen und ihre Fehlerquellen.
Zeitschrift für die Gesamte Experimentelle Medizin 151: 331-349 (1969).
95. THOM, R., V.KACHEL:
Fortschritte für die elektronische Größenbestimmung von Blutkörperchen.
Blut 21: 48-50 (1970).
96. THOMAS, L.:
Labor und Diagnose. Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik.
Marburg/Lahn, Medizinische Verlagsgesellschaft, 1984.
97. UEMURA, K., Z.PISA:
Recent trends in cardiovascular disease mortality in 27 industrialized countries.
World health statistical quarterly 38: 142-162 (1985).

98. USAMI, S.:
Physiological significance of blood rheology.
Biorheology 19: 29-46 (1982).
99. VIDAVER, G.A., A.TING, J.W.LEE:
Evidence that lysolecithin is an important causal agent
of atherosclerosis.
Journal of Theoretical Biology 115: 27-41 (1985).
100. WARREN, L.:
Thiobarbituric acid assay of sialic acids.
Methods of Enzymology 6: 463-465 (1963).
101. WARREN, L.:
The thiobarbituric acid assay of sialic acids.
Journal of Biological Chemistry 234: 1971-1975 (1959).
102. WIETELMANN, H.:
Untersuchungen zur Bestimmungsmethodik der
Erythrozytenaggregation und zur Altersabhängigkeit
dieser Messwerte bei gesunden Probanden.
Dissertation, Universität Gießen, 1978.
103. WILSON, P.W., R.J.GARRISON, W.P.CASTELLI, M.FEINLEB,
P.M.McNAMARA, W.B.KANNEL:
Prevalence of coronary heart disease in the Framingham
offspring study: role of lipoprotein cholesterols.
American Journal of Cardiology 46: 649-654 (1980).
104. WITT, I., K.HASLER:
Influence of organically bound phosphorus in foetal and
adult fibrinogen on the kinetics of the interaction
between thrombin and fibrinogen.
Biochimica et Biophysica Acta 271: 357-362 (1972).

105. YAARI, S., U.GOLDBOURT, S.EVEN-ZOHAR, H.N.NEUFELD:
Associations of serum high density lipoprotein and
total cholesterol with total, cardiovascular, and
cancer mortality in a 7-year prospective study of
10000 men.
Lancet I: 1011-1015 (1981).
106. Proposal for the multinational monitoring of trends and
determinants in cardiovascular disease and protocol
(MONICA Project).
World Health Organization, Genf, 1983.
107. Wissenschaftliche Tabellen, 7.Aufl.
Documenta Geigy, Ciba-Geigy, 1975.

Lebenslauf

11.01.1956	als 1.Kind von Dr. Ernst und Agnes Mößmer • in Zürich/Schweiz geboren
1962-1966	Volksschule in München
1966-1975	Humanistisches Gymnasium (Wittelsbacher- Gymnasium, München)
Mai 1975	Abitur
1975-1976	Zivildienst als Krankenpfleger in der Chirurgischen Klinik des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München
November 1976	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München
August 1978	Ärztliche Vorprüfung
August 1979	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
August 1982	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Oktober 1983	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
15.11.1983	Approbation als Arzt
1983-1987	Promotionsstudium an der LMU München
März 1984 - Februar 1987	Doktorand am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried (Arbeitsgruppe Experimentelle Medizin) Promotionsstipendiat der Studienstiftung des Deutschen Volkes

